

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**Estudos de Estabilidade de Diferentes Formas da
Fenilalanina Hidroxilase Humana**

Cátia Alexandra Cardoso de Araújo Nascimento

DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA
BIOQUÍMICA

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**Estudos de Estabilidade de Diferentes Formas da
Fenilalanina Hidroxilase Humana**

Tese realizada sob a supervisão da Professora Doutora Ana
Paula Leandro e da Professora Doutora Isabel Tavares de
Almeida

Cátia Alexandra Cardoso de Araújo Nascimento

DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA
BIOQUÍMICA

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA

**Estudos de Estabilidade de Diferentes Formas da
Fenilalanina Hidroxilase Humana**

Cátia Alexandra Cardoso de Araújo Nascimento

DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA
BIOQUÍMICA

2007

O trabalho apresentado nesta tese foi efectuado no Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa sob a orientação das Professoras Doutoradas Ana Paula Leandro e Isabel Tavares de Almeida e em colaboração com o Doutor Cláudio Gomes do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa.

Cátia Alexandra Cardoso de Araújo Nascimento recebeu uma bolsa de doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/10807/2002). O trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto de investigação POCTI/MGI/40844/2001, subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Farmácia da Universidade de
Lisboa para Obtenção do grau de
Doutor**

Resumo

A fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600) e hiperfenilalaninémias com ela relacionadas (HPA) são patologias associadas a uma sintomatologia grave, essencialmente do foro neurológico. A PKU resulta de uma deficiente actividade da fenilalanina hidroxilase (hPAH; EC 1.14.16.1), uma enzima homotetramérica codificada pelo gene *PAH*. A PAH é uma proteína instável, muito susceptível a alterações na sua sequência primária, como comprovado pelas mais de 500 mutações identificadas como causadoras de doença. Pretendeu-se com o presente trabalho: (i) identificar os mecanismos moleculares subjacentes à instabilidade observada quer para a hPAH selvagem (hPAHwt) quer para as formas mutantes mais frequentes na população PKU portuguesa; (ii) identificar formas mutantes quiméricas que apresentassem maior estabilidade e; (iii) definir estratégias experimentais que permitam modular a sua actividade *in vivo* e *in vitro*.

Os resultados obtidos indicam que a instabilidade observada para a hPAHwt *in vitro* é causada pelo fenómeno de agregação. A utilização de agentes estabilizantes, nomeadamente o glicerol a 50% e o manitol a 10% permitiu recuperar quer a actividade quer o teor de proteína recombinante após 1 mês de armazenamento a -20°C, contribuindo para que a proteína em solução mantenha o seu perfil oligomérico e características cinéticas, prevenindo a formação de agregados. Dados semelhantes foram obtidos após liofilização na presença de sacarose a 5% e de trealose a 5%. Esta proteína mantém cerca de 100% da sua actividade inicial, não sofre desamidação não enzimática (após um mês de armazenamento) e encontra-se exclusivamente na sua forma tetramérica mais activa.

A expressão de proteínas mutantes na presença, *in vivo*, dos osmólitos naturais glicerol a 1%, taurina a 10 mM e N-óxido de trimetilamina a 5 mM (TMAO) demonstrou que estes agentes têm um efeito estabilizador da cadeia polipeptídica mutante recém-sintetizada contribuindo para o aumento da actividade enzimática das formas mutantes e uma diminuição da percentagem de formas agregadas. Este efeito, que parece ser dependente do osmólito e da mutação em causa, poderá estar relacionado com a área superficial acessível ao solvente. A caracterização das formas tetraméricas mutantes estabilizadas pelo glicerol indica que o aumento de actividade observado estará relacionado com a formação de um estado conformacional intermédio mais estruturado.

A selecção de resíduos de aminoácidos específicos permitiu produzir proteínas hPAH quiméricas com maior actividade e estabilidade. De entre as proteínas estudadas a C29S e a E360K apresentaram um maior nível de expressão e actividade e, em solução, um incremento na sua estabilidade ao longo do tempo de armazenamento, a -20°C, na presença de manitol a 10%. Mais uma vez, constatou-se que a modulação da actividade enzimática se encontra directamente relacionada com uma diminuição da presença de formas agregadas.

A modulação, quer *in vitro* quer *in vivo*, da estabilidade da proteína hPAH selvagem e formas mutantes (patogénicas e quiméricas) poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da PKU.

Abstract

Phenylketonuria (PKU; OMIM 261600) and related forms of hyperphenylalaninemia (HPA) are pathologies presenting a severe neurological impairment caused by a deficient activity of phenylalanine hydroxylase (hPAH; EC 1.14.16.1). PAH is a homotetrameric enzyme codified by the *PAH* gene, which presents a high degree of instability. This enzyme is very susceptible to changes in its primary structure as demonstrated by the identification of more than 500 disease-causing mutations identified all over its structure. In the present work we aimed to: (i) identify the molecular mechanisms underlying the observed instability of the hPAH wild-type (PAHwt) and of the most frequent mutant forms of this protein presented by the Portuguese PKU population; (ii) identify chimerical mutant forms presenting higher stability; and (iii) delineate experimental strategies allowing the *in vitro* and *in vivo* modulation of protein activity.

The obtained results indicate that the observed *in vitro* hPAHwt instability is mainly caused by protein aggregation. The use of stabilizing agents, namely 50% glycerol and 10% mannitol, preserves the content and activity of the recombinant protein after one month storage at -20°C, preventing protein aggregation and maintaining its oligomeric profile and kinetic properties. Similar data were obtained after protein lyophilisation in the presence of 5% trehalose or 5 % sucrose. The obtained enzyme, found mainly in its more active tetrameric form, maintains about 100% of its initial activity and is not susceptible to non-enzymatic deamidation (after a one month storage).

The expression of mutant hPAH proteins in the presence of the natural osmolytes glycerol (1%), taurine (10 mM) and trimethylamine-N-oxide (TMAO; 5 mM) demonstrated that *in vivo* these agents present a stabilizing effect over the newly-synthesized mutant proteins, inducing an increase in the enzyme activity and a decrease in the percentage of aggregated forms. This effect, which appears to be mutation and osmolyte-dependent, maybe directly related to the solvent accessible surface area. The characterization of glycerol stabilized tetrameric mutant forms indicates that the observed increase in the enzyme activity results from the stabilization of a more structured intermediate state.

The selection of specific aminoacid residues allowed the production of chimerical hPAH proteins presenting higher activity and stability. Among the studied proteins, the C29S and E360K presented an increment in the expression level and activity, and a higher stability when stored as a solution during one month at -20°C in the presence of 10% mannitol. Once again, aggregation was the major factor affecting stability.

The *in vitro* and *in vivo* modulation of the stability of hPAH, wild-type and mutant forms (disease-causing and chimerical) may contribute to the development of new approaches for the treatment of PKU.

Palavras Chave

Fenilalanina Hidroxilase

Fenilcetonúria

Chaperones

Estabilização

Phenylalanine Hydroxylase

Phenylketonuria

Chaperones

Stabilization

ÍNDICE GERAL

Resumo	vi
Abstract	vii
Palavras Chave	ix
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xvi
Índice de Tabelas	xxi
Abreviaturas	xxiii
Objectivos	xxvii

PARTE I – INTRODUÇÃO GERAL ***I***

1. Introdução	3
2. Hidroxilases dos amino ácidos aromáticos	4
3. A Fenilalanina hidroxilase	5
3.1. Características estruturais	6
3.2. Mecanismo catalítico	10
3.3. Propriedades enzimáticas	12
3.4. Propriedades físico-químicas	14
3.5. Modificações pós-tradução	15
3.6. Função fisiológica	16
4. Deficiência na Fenilalanina hidroxilase humana	17
4.1. O gene PAH	17
4.2. Variantes alélicas	18
4.3. Fenótipos associados	19
4.4. Patogénese	21
4.5. Rastreio e diagnóstico	22
4.6. Tratamento	22
4.7. Hiperfenilalaninémia materna	24

PARTE II – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	25
1. Introdução	27
2. Expressão e purificação da proteína selvagem e formas mutantes	28
2.1. Estirpes de bactérias e vectores	28
2.2. Obtenção das formas mutantes do cDNA PAH	30
2.2.1. Reacção de mutagénese dirigida	30
2.2.2. Preparação dos <i>constructs</i> mutagenizados	32
2.2.3. Rastreio da eficácia da reacção de mutagénese dirigida	33
2.2.4. Sequenciação do cDNA mutagenizado	35
2.3. Indução da expressão proteica	35
2.4. Purificação das proteínas PAH recombinantes	36
2.5. Isolamento das diferentes formas oligoméricas	38
3. Ensaio de estabilização <i>in vivo</i> de formas hPAH patogénicas	38
3.1. Chaperones químicos estudados <i>in vivo</i>	38
3.2. Expressão das proteínas recombinantes	38
4. Ensaio de estabilidade <i>in vitro</i> da forma selvagem	38
4.1. Estabilizantes utilizados	38
4.2. Ensaio em solução	39
4.3. Ensaio de liofilização	39
5. Caracterização das proteínas recombinantes produzidas	40
5.1. Quantificação proteica	40
5.2. Avaliação do grau de pureza	40
5.3. Determinação do pI	41
5.4. Determinação da composição oligomérica	43
5.5. Análise das proteínas recombinantes por Western blotting	44
5.6. Caracterização enzimática	45
5.6.1. Determinação da actividade enzimática	45
5.6.2. Determinação dos parâmetros cinéticos	46
5.7. Avaliação da conformação das proteínas recombinantes	47
5.7.1. Proteólise limitada	47
5.7.2. Espectros de fluorescência	47
5.7.3. Ensaio de <i>quenching</i>	48
5.7.4. Espectros de dicroísmo circular no UV longínquo	49

5.8. Ensaaios de estabilidade proteica	49
5.8.1. Equilíbrio de desnaturação	49
5.8.2. Perfil de inativação térmica	51
5.8.3. Perfil de estabilidade térmica	51
5.9. Análise dos resultados	51
<i>PARTE III – RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	53
<i>CAPÍTULO I - Estabilização in vitro da fenilalanina hidroxilase humana na presença de adjuvantes</i>	55
1. Introdução	57
1.1. As proteínas como agentes terapêuticos	57
1.2. Proteínas em solução	58
1.3. Liofilização de proteínas	60
2. Ensaaios de estabilidade da enzima recombinante 6xHis-hPAH em solução	61
2.1. Teor proteico	62
2.2. Actividade enzimática	65
2.3. Avaliação do estado de desnaturação	67
2.4. Avaliação do estado de oligomerização	68
2.5. Propriedades enzimáticas	73
2.6. Proteólise limitada	77
2.7. Acessibilidade dos resíduos de triptofano	78
3. Ensaaios de liofilização da enzima recombinante 6xHis-hPAH	79
3.1. Avaliação do poder protector de vários agentes estabilizantes	80
3.2. Optimização da concentração dos estabilizantes mais eficazes	83
3.3. Ensaaios de estabilidade ao longo do tempo após liofilização	85
3. Discussão	88

CAPÍTULO II – Estabilização in vivo de formas mutantes da fenilalanina hidroxilase humana: acção de chaperones químicos **93**

1. Introdução	95
2. Identificação das concentrações óptimas de chaperones químicos	97
2.1. Efeito sobre o teor e actividade das proteínas expressas	97
3. Caracterização das proteínas mutantes produzidas na presença das concentrações óptimas dos chaperones químicos mais eficazes.	101
3.1. Rendimento proteico	101
3.2. Perfil de oligomerização	103
3.3. Espectros de fluorescência	105
3.4. Perfis de estabilidade térmica	107
3.5. Perfil de inactivação enzimática	108
3.6. Avaliação do nível de expressão do sistema groESL	110
4. Caracterização das formas tetraméricas	111
4.1. Estrutura secundária	112
4.2. Curvas de desnaturação	114
4.3. Acessibilidade dos resíduos de triptofano	116
5. Discussão	117

CAPÍTULO III - Produção de formas quiméricas da fenilalanina hidroxilase humana: efeito da substituição de aminoácidos específicos na actividade e estabilidade enzimática **121**

1. Introdução	123
2. Produção de formas quiméricas da 6xHis-hPAH	124
2.1. Construção de cDNAs mutantes	124
2.2. Expressão das proteínas mutantes	127
2.3. Avaliação da actividade enzimática	128
2.4. Determinação do perfil de oligomerização	129
2.5. Espectros de fluorescência	130
2.6. Perfis de estabilidade térmica	131
2.7. Características enzimáticas	133
2.8. Proteólise com tripsina	134

2.9. Ensaios de desnaturação com ureia	135
2.10. Estabilidade das enzimas C29S e E360K ao longo do tempo	137
3. Discussão	138
 <i>PARTE IV - CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS</i>	 145
 <i>PARTE V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	 151
 <i>ANEXOS</i>	 167

Índice de Figuras

I.1.	Hidroxilação dos aminoácidos aromáticos pelas respectivas hidroxilases	4
I.2.	Diferentes perspectivas do modelo da forma tetramérica da fenilalanina hidroxilase.	6
I.3.	Modelo de um monómero da forma humana da fenilalanina hidroxilase.	7
I.4.	Representação de um dímero da fenilalanina hidroxilase de rato, evidenciando os pontos de contacto entre o domínio regulador de um monómero e o domínio catalítico do outro monómero.	7
I.5.	Estruturas do centro activo. a) Vista dos resíduos coordenados de Ferro. b) Modelo do complexo catalítico da PAH humana, com as moléculas de L-Phe, BH ₄ e O ₂ ligadas, formando um complexo ferro-peroxi.	8
I.6.	Pormenor da estrutura do domínio de tetramerização da fenilalanina hidroxilase.	9
I.7.	Formas oligoméricas da fenilalanina hidroxilase humana. O tetrâmero, onde cada sub-unidade está representada com uma cor diferente, é constituído por um dímero de dímeros, AC e BD, respectivamente.	9
I.8.	Sistema de hidroxilação hepática da fenilalanina (L-Phe) mediada pela fenilalanina hidroxilase (PAH).	10
I.9.	Mecanismo catalítico proposto para a hidroxilação da L-Phe pela enzima PAH.	12
I.10.	Vias de metabolização de L-fenilalanina.	17
II.1.	Representação do vector pTrcHis.	29
III.I.1.	Análise por SDS-PAGE da proteína 6xHis hPAHwt recombinante.	61
III.I.2.	Variação da quantidade de 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a 4°C, na presença de diferentes agentes estabilizantes.	62
III.I.3.	Análise por SDS-PAGE, ao longo do tempo de armazenamento, da proteína 6xHis-hPAHwt conservada nos vários estabilizantes.	63

III.I.4.	Variação da quantidade de 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a -20°C, na presença de diferentes agentes estabilizantes.	64
III.I.5.	Variação da actividade residual da 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a 4°C, na presença de diferentes agentes estabilizantes.	65
III.I.6.	Variação da actividade residual da 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a -20°C, na presença de diferentes agentes estabilizantes.	66
III.I.7.	Espectros de fluorescência da proteína 6xHis-hPAHwt na forma nativa e após desnaturação com ureia.	67
III.I.8.	Espectros de fluorescência da proteína 6xHis-hPAHwt, após 30 dias de armazenamento, a 4°C (A) e a -20°C (B) na presença dos agentes estabilizantes em estudo.	68
III.I.9.	Cromatografia de exclusão molecular de alta resolução (HPLC-SEC) de uma solução de padrão de massas moleculares <i>Gel filtration standard</i> (A) e da proteína 6xHis-hPAHwt recombinante (B).	69
III.I.10.	Análise comparativa do estado de oligomerização da proteína 6xHis hPAHwt recombinante, conservada a -20°C, ao fim de 15 dias e ao fim de 30 dias na presença dos vários adjuvantes em estudo.	71
III.I.11.	Efeito da concentração do substrato (L-Phe) na actividade catalítica da enzima 6xHis-hPAHwt.	73
III.I.12.	Efeito da concentração do substrato (L-Phe) na actividade catalítica da enzima 6xHis-hPAHwt após 30 dias de armazenamento, a -20°C.	74
III.I.13.	Análise através de géis bidimensionais da proteína 6xHis hPAHwt recombinante ao fim de 30 dias.	75
III.I.14.	Resistência à proteólise da 6xHis-hPAH wt, após purificação (t ₀) e após 30 dias de armazenamento	77
III.I.15.	Avaliação da quantidade (A) e do perfil electroforético (B) da proteína 6xHis-hPAHwt recuperada após liofilização na ausência (tampão) e na presença de diferentes agentes estabilizantes.	80
III.I.16.	Percentagem de recuperação da actividade enzimática específica da proteína 6xHis-hPAHwt recombinante, antes (t _a) e após liofilização, na ausência (tampão) e na presença dos vários	

	agentes estabilizantes estudados.	82
III.I.17.	Percentagem de proteína 6xHis-hPAH recuperada após liofilização na presença de diferentes concentrações de sacarose, glucose e trealose.	84
III.I.18.	Percentagem de recuperação da actividade específica da proteína 6xHis-hPAH após liofilização na presença de diferentes concentrações de sacarose, glucose e trealose.	84
III.I.19.	Quantidade (A) e perfil electroforético (B) da amostra de 6xHis-hPAHwt, liofilizada na presença de trealose a 5%, ao longo do tempo de armazenamento a 4°C.	85
III.I.20.	Actividade específica, em percentagem, da amostra de 6xHis-hPAHwt, liofilizada na presença de trealose a 5%, ao longo do tempo de armazenamento a 4°C.	86
III.I.21.	Análise por electroforese bidimensional (2D SDS-PAGE) da proteína 6xHis hPAHwt recombinante, liofilizada na presença de 5% de trealose, ao longo do tempo de armazenamento a 4°C. (A) Perfil electroforético da solução padrão (B) 6xHis hPAHwt recombinante.	88
III.II.1.	Efeito da variação da concentração de glicerol na actividade específica da 6xHis-hPAHwt e formas mutantes.	97
III.II.2.	Efeito da variação da concentração de TMAO na actividade específica da 6xHis-hPAHwt e formas mutantes.	98
III.II.3.	Efeito da variação da concentração de taurina na actividade específica da 6xHis-hPAHwt e formas mutantes.	99
III.II.4.	Efeito da variação da concentração de 4-PBA na actividade específica da 6xHis-hPAHwt e formas mutantes.	100
III.II.5.	Aumento de actividade enzimática para as várias proteínas mutantes produzidas na presença dos chaperones químicos.	101
III.II.6.	Análise por western blotting do extracto bruto celular após indução, das proteínas 6xHis-hPAH wt e mutantes, na ausência e presença de 1 % de glicerol.	102
III.II.7.	Quantidade de proteína 6xHis-hPAH wt e mutantes, produzidas na ausência e presença de 1 % de glicerol.	102
III.II.8.	Perfil de oligomerização apresentado pelas formas mutantes I65T (A), R261Q (B), R270K (C) e V388M (D) quando produzidas na ausência ou presença dos chaperones químicos glicerol e TMAO.	105

III.II.9.	Espectro de emissão de fluorescência das formas mutantes I65T (A), R261Q (B), R270K (C) e V388M (D) produzidas na ausência de chaperones ou na presença dos chaperones químicos glicerol 1% e TMAO 5mM.	106
III.II.10.	Perfil de estabilidade térmica das das formas mutantes I65T (A), R261Q (B) e V388M (C) produzidas na ausência de chaperones ou na presença dos chaperones químicos glicerol 1% e TMAO.	108
III.II.11.	Perfil de inativação das proteínas mutantes I65T (A), R261Q (B) e V388M (C) a 37°C, na ausência de chaperones e na presença dos chaperones químicos glicerol a 1% e TMAO.	109
III.II.12.	Análise, por western-blotting, da expressão do sistema de chaperones moleculares GroESL.	110
III.II.13.	Perfil cromatográfico (SEC) da proteína 6xHis-hPAHwt e formas mutantes I65T, R261Q e V388M produzidas na ausência e presença de glicerol a 1%.	111
III.II.14	Espectros de dicroísmo circular no UV longínquo, das estruturas secundárias: hélices α , folhas β e <i>random coil</i> .	112
III.II.15.	Espectros de dicroísmo circular no UV longínquo das formas tetraméricas da 6xHis-hPAHwt (A) e das formas mutantes I65T (B), R261Q (C) e V388M (D) produzidas na ausência e na presença de glicerol a 1%.	113
III.II.16.	Espectros de dicroísmo circular no UV longínquo da forma dimérica da proteína mutada I65T, na presença e ausência de 1% de glicerol.	114
III.II.17.	Curvas de desnaturação térmica das proteínas 6xHis-hPAH, obtidas por far-UV CD; produzidas na ausência de glicerol, produzidas na presença de glicerol.	115
III.II.18.	Curvas de desnaturação térmica, determinadas por fluorescência; proteínas produzidas na ausência de chaperones, proteínas produzidas na presença de 1% glicerol.	116
III.II.19	Modelo propostoo para a actuação dos chaperones químicos sobre proteínas mutantes estruturalmente afectadas.	119
III.III.1.	Controlo da estrutura dos DNAs obtidos por mutagénesse dirigida.	125
III.III.2.	Sequenciação do DNA obtido por mutagénesse dirigida.	126

III.III.3.	Análise por SDS-PAGE da forma selvagem e formas mutantes das proteínas recombinantes 6xHis PAH após purificação.	127
III.III.4.	Actividades residuais das diversas formas de proteínas 6xHis hPAH recombinantes. As percentagens foram calculadas em relação à forma selvagem (100%).	129
III.III.5.	Espectro de emissão de fluorescência das enzimas mutadas C29S (A), C284S (B), C445S (C), D145K (D) e E360K (E), na ausência e presença de 1 mM de L-Phe.	131
III.III.6.	Perfil de estabilidade térmica das enzimas recombinantes 6xHis hPAH.	132
III.III.7.	Efeito da concentração de L-Phe sobre a actividade catalítica das proteínas recombinantes C29S (A) e E360K (B).	133
III.III.8.	Quantidade de proteína recombinante 6xHis hPAH resistente à proteólise pela tripsina.	135
III.III.9.	Curvas de desnaturação com ureia das proteínas recombinantes 6xHis hPAH C29S (A) e E360K (B).	136
III.III.10.	Actividade enzimática das diferentes formas recombinantes do 6xHis hPAH ao longo do tempo de armazenamento a -20°C, em 50% de glicerol (A) e em 10% de manitol (B).	138
III.III.11.	Localização dos resíduos alvo de mutagenização para produção de proteínas 6xHis-hPAH quiméricas.	138
III.III.12.	Representação da estrutura secundária da proteína PAH truncada com deleção da sequência N-terminal	142

Índice de Tabelas

II.1.	Oligonucleótidos utilizados nas técnicas de mutagénese dirigida, PCR e sequenciação.	31
II.2.	Programas de PCR utilizados na técnica de mutagénese dirigida e para confirmação da sua eficácia.	32
II.3.	Primers, reacções de PCR e enzimas de restrição (ER) utilizados para rastreio da eficácia da reacção de mutagénese dirigida.	34
II.4.	Condições de armazenamento testadas nos ensaios de estabilidade em solução: agentes estabilizantes, tempo e temperatura de armazenamento.	39
II.5.	Condições utilizadas na focagem isoelectrica.	42
III.I.1	Massa molecular e percentagem relativa das diversas formas oligoméricas apresentadas pela proteína 6xHis-hPAHwt recombinante após purificação.	70
III.I.2	Percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas da 6xHis-hPAH após 30 dias de armazenamento a -20°C.	72
III.I.3	Propriedades enzimáticas da 6xHis-hPAH wt em diferentes soluções, após purificação (t0) e após 30 dias de armazenamento.	76
III.I.4.	Constantes de Quenching e fracção de acessibilidade da 6xHis-hPAH em diferentes soluções.	79
III.I.5.	Análise do perfil de oligomerização da 6xHis-hPAH wt após liofilização, na ausência e presença de estabilizantes.	83
III.II.1.	Percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas identificadas por HPLC-SEC das diferentes formas de 6xHis-hPAH mutantes em estudo, produzidas na ausência e na presença de diferentes chaperones químicos(glicerol, TMAO e taurina) com e sem pré-activação pelo substrato L-Phe.	104
III.II.2.	Constantes de quenching com o KI e acrilamida apresentadas pelas formas tetraméricas da proteína 6xHis-hPAHwt e pelas formas mutantes I65T, R261Q e V388M produzidas na ausência e na presença de glicerol a 1%.	117
III.II.3.	Alteração prevista na área superficial acessível (ASA) para as mutações e número de resíduos afectados	119

III.III.1.	Enzimas de restrição para rastreio das alterações introduzidas por mutagénese e tamanhos dos fragmentos obtidos.	124
III.III.2.	Rendimentos e grau de pureza das proteínas 6xHis-hPAH.	127
III.III.3	Actividade específica das proteínas 6xHis hPAH selvagem, quiméricas e V388M.	128
III.III.4	Percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas da proteína 6xHis-hPAH com e sem activação pelo substrato.	130
III.III.5	Propriedades cinéticas das diversas formas da 6xHis hPAH recombinante.	134
III.III.6.	Parâmetros termodinâmicos das proteínas recombinantes 6xHis hPAH wt, C29S e E360K.	137
III.III.7.	Parâmetros de acessibilidade ao solvente dos resíduos mutados da proteína hPAH calculados utilizando os programas NETASA e CUPSAT	139
III.III.8.	Parâmetros de acessibilidade ao solvente e estabilidade proteica resultantes das mutações da proteína hPAH calculados utilizando os programas NETASA e CUPSAT	140

Abreviaturas

4-OH-BH ₄	4-hidroxi-tetrahidropterina
4-PBA	4-fenilbutirato
5-OH-Trp	5-hidroxitriptofano
6-MPH ₄	6-metil-tetra-hidropterina
A	Adenina
AAOHs	Hidroxilases dos L-aminoácidos aromáticos
Amp	Ampicilina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido Aspártico
BH ₄	6(R)-L- <i>eritro</i> -5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
Bp	Pares de bases
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CHAPS	3-[(3-Coloamidopropil)dimetilamónia]-1-propano sulfonato
Cm	Cloranfenicol
Cys (C)	Cisteína
Da	Dalton
DHPR	Di-hidropterina reductase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanina
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido Glutâmico
GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
His (H)	Histidina
HPA	Hiperfenilalaninémia
Hpah	Fenilalanina Hidroxilase Humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
HPLC	High Precision Liquid Chromatography

IMAC	Cromatografia de afinidade com iões metálicos
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosidase
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
L-Phe	L-Fenilalanina
L-Trp	L-triptofano
Lys (K)	Lisina
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
Met (M)	Metionina
mRNA	RNA mensageiro
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
ON	Durante a noite
PAGE	Electroforese em gel de acrilamida
PAH	Fenilalanina Hidroxilase
PAL	Fenilalanina Amónia Liase
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno-glicol
PKU	Fenilcetonúria
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluoreto
Pro (P)	Prolina
RBS	Ribosome binding site
Rnase	Ribonuclease
rPAH	Fenilalanina Hidroxilase de Rato
SDS	Mono dodecil sulfato de sódio
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
Ser (S)	Serina
T	Timina
TCA	Ácido tricloro acético
TMAO	Óxido de trimetilamina
TPH	Triptofano Hidroxilase
Trp (W)	Triptofano
TYH	Tirosina Hidroxilase
Tyr (Y)	Tirosina
wt	Wild-type (selvagem)

Como previsto no nº2 do artigo 8º do Decreto-Lei nº388/70 de 18 de Agosto, sobre o Regulamento de Doutoramento da Universidade de Lisboa, parte dos resultados desta tese encontram-se submetidos para publicação em co-autoria e foram apresentados em comunicações orais ou sobre a forma de painel.

Artigos

1. C Nascimento, AM Conceição, L Ramos, AJ Almeida, I Tavares de Almeida, P Leandro. "Studies on the *in vitro* stability of human phenylalanine hydroxylase: the effect of polyol additives". *Submetido*
2. C Nascimento, J Ventura, I Tavares de Almeida, P Leandro. "Modulation of the enzyme activity of newly-synthesized mutant forms of human phenylalanine hydroxylase by natural osmolytes". *Submetido*
3. C Nascimento, L Ramos, I Tavares de Almeida, P Leandro. "Lyophilization of human phenylalanine hydroxylase: protective mechanism of stabilizing additives". *Submetido*
4. C Nascimento, C Coelho, I Tavares de Almeida, P Leandro. "Missense mutations in the *PAH* gene can result in chimerical proteins with higher activity. *Submetido*.

Publicações em actas de encontros científicos

1. Cátia Nascimento, Paula Leandro, Joaquim Ventura e Isabel Tavares de Almeida. "Recovering the *in vivo* activity of PAH mutant enzymes using chemical chaperones: a target for therapeutics?". Rev Port de Farmácia, 2003; LII(1) Supl: O-9.
2. Cátia Nascimento, Ana Marta Conceição, Paula Leandro e Isabel Tavares de Almeida. "Chemical chaperones enhanced the stability and folding of V388M mutant phenylalanine hydroxylase". J Inher Metabol Dis, 2004; 27 (Suppl 1): 063-P.
3. João Leandro, Cátia Nascimento, Isabel Tavares de Almeida e Ana Paula Leandro. "Effect of mannitol and glycerol on the storage stability of human phenylalanine hydroxylase". Rev Port de Farmácia, 2005; LII(2) Supl: OC-3.

-
4. Cátia Nascimento, Catarina Coelho, João Leandro, Isabel Tavares de Almeida e Paula Leandro, “Biochemical characterization of chimerical mutant forms of human phenylalanine hydroxylase: a contribution to the understanding of enzyme stabilization”. FEBS J. 2005; 272 (Suppl 1): G2-084P.

Comunicações Orais

1. Cátia Nascimento, Paula Leandro Joaquim Ventura e Isabel Tavares de Almeida. “Recovering the *in vivo* activity of PAH mutant enzymes using chemical chaperones: a target for therapeutics?”. 1º Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Farmacêuticas. Lisboa, Portugal, Abril de 2003.
2. Cátia Nascimento, João Leandro, Isabel Rivera, Paula Leandro e Isabel Tavares de Almeida. “Functional Characterization of *PAH* missense mutations affecting the Portuguese PKU population” II Simpósio da Sociedade Portuguesa das Doenças Metabólicas. Porto, Portugal, Novembro de 2004.
3. João Leandro, Cátia Nascimento, Isabel Tavares de Almeida e Ana Paula Leandro. “Effect of mannitol and glycerol on the storage stability of human phenylalanine hydroxylase”. 2nd Congress of the Portuguese Society of Pharmaceutical Sciences. Coimbra, Portugal, Abril de 2005.

Comunicações sob a forma de painel

1. Paula Leandro, Cátia Nascimento, Joaquim Ventura e Isabel Tavares de Almeida. “Activation of mutant forms of Phenylalanine Hydroxylase by the natural osmolytes glycerol and trimethylamine N-oxide (TMAO)”. XIII Congresso Nacional de Bioquímica. Lisboa, Portugal, Dezembro de 2002.
2. Cátia Nascimento, Paula Leandro e Isabel Tavares de Almeida. “*In vivo* modulation of the assembly of PAH mutant proteins by chemical chaperones”. I simpósio da Sociedade Portuguesa das Doenças Metabólicas. Lisboa, Portugal, Novembro de 2003.
3. Cátia Nascimento, Ana Marta Conceição, Paula Leandro e Isabel Tavares de Almeida. “Chemical chaperones enhanced the stability and folding of V388M

-
- mutant phenylalanine hydroxylase”. SSIEM 41st Annual Symposium of Inherited Metabolic Disease (publicado no *Journal of Inherited Metabolic Disease*). Amsterdão, Holanda, Setembro de 2004.
4. Ana Marta Conceição, Cátia Nascimento, António José Almeida, Isabel Tavares de Almeida e Paula Leandro. “Preserving human phenylalanine hydroxylase activity: mechanism of polyol-induced *in vitro* stabilization” 3rd Portuguese-Spanish Biophysics Congress. Lisboa, Portugal, Novembro de 2004.
 5. Cátia Nascimento, Isabel Tavares de Almeida e Paula Leandro. “Limited proteolysis and non-enzymatic deamidation of V388M phenylalanine hydroxylase produced in the presence of osmolytes”. XIV Congresso Nacional de Bioquímica. Vilamoura, Portugal, Dezembro de 2004.
 6. Cátia Nascimento, Catarina Coelho, João Leandro, Isabel Tavares de Almeida e Paula Leandro, “Biochemical characterization of chimerical mutant forms of human phenylalanine hydroxylase: a contribution to the understanding of enzyme stabilization”. 30th FEBS congress. Budapeste, Hungria, Julho de 2005.
 7. Cátia Nascimento, Isabel Tavares de Almeida e Paula Leandro “Mild hPAH mutations: modulation of enzymatic activity using natural osmolytes, 3^o Simpósio Internacional da Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas. Luso, Portugal, Novembro de 2005.
 8. Cátia Nascimento, Cláudia Oliveira, Carlos Acosta, Isabel Tavares de Almeida e Paula Leandro. “Structure-based modification of human phenylalanine hydroxylase: production of an enzyme with higher stability”. VI Iberoamerican Congress of Biophysics. Madrid, Espanha, Setembro de 2006.
 9. Cátia Nascimento, Luís Ramos, Isabel Tavares de Almeida e Paula Leandro. “Effect of additives on the biological function of recombinant human phenylalanine hydroxylase: solution and liophilization assays. XV Congresso Nacional de Bioquímica. Aveiro, Portugal, Dezembro de 2006
 10. Cátia Nascimento, Catarina Coelho, Cláudia Oliveira, Carlos Acosta, Isabel Tavares de Almeida e Paula Leandro. “Modification of phenylalanine hydroxylase by site-directed mutagenesis: production of chimerical proteins with higher stability” SSIEM symposium 2007, Hamburgo, Alemanha, Setembro de 2007
 11. Cátia Nascimento, Hugo M. Botelho, I Tavares de Almeida, Cláudio M. Gomes e Paula Leandro. “Folding rescue of mild PKU mutations by chemical chaperones”. SSIEM symposium 2007. Hamburgo, Alemanha, Setembro de 2007.
-

OBJECTIVOS

Identificada no início dos anos 50 por Udenfried e Cooper (Udenfried S e Cooper JR, 1952), a fenilalanina hidroxilase (PAH) tem sido objecto de estudo intensivo dado a sua deficiente actividade estar na origem da fenilcetonúria (PKU), o erro hereditário mais comum do metabolismo dos aminoácidos. Passados 50 anos são ainda significativas as questões que permanecem por elucidar, nomeadamente: o modo como as diferentes subunidades mutantes se associam para formar a proteína (fenómeno de complementação interalélica); o mecanismo molecular subjacente à instabilidade observada quer para a forma selvagem quer para as diferentes formas mutantes ou ainda a clarificação da estrutura da forma *full-length* da proteína selvagem. A completa identificação das propriedades funcionais e estruturais da PAH é fundamental para um melhor conhecimento das bases moleculares da PKU, podendo conduzir ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Assim o trabalho desenvolvido nesta tese tem como objectivo último:

- (i) a obtenção de cristais regulares de uma forma tetramérica da hPAH *full-length*, utilizando uma proteína estável e homogénea (selvagem ou quimérica);
- (ii) o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento da PKU nomeadamente, por terapia enzimática de substituição após formulação de formas estáveis da hPAH (selvagem ou quimérica) ou pela utilização de chaperones químicos.

Assim, é crucial a obtenção de formas estáveis da PAH quer da sua forma selvagem quer de formas mutantes e os objectivos específicos deste trabalho foram a:

- (i) estabilização *in vitro* da hPAH selvagem, em solução e após liofilização, utilizando agentes adjuvantes (Parte III, Capítulo I);
- (ii) estabilização *in vivo* das formas mutantes da hPAH mais frequentes da população PKU portuguesa, por chaperones químicos (Parte III, Capítulo II);
- (iii) produção de formas quiméricas da hPAH que apresentem maior estabilidade e actividade (Parte III, capítulo III).

I. INTRODUÇÃO GERAL

I. INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução

A hiperfenilalaninémia (HPA) resulta de alterações no sistema de hidroxilação do aminoácido L-fenilalanina (L-Phe). Este sistema é complexo, estando dependente não só da acção da fenilalanina hidroxilase (PAH; EC 1.14.16.1), mas também de várias enzimas responsáveis pela síntese e regeneração do cofactor 6(R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄), necessário à reacção de hidroxilação. No entanto, a maioria das HPAs (cerca de 99%) resultam de uma deficiente actividade da PAH sendo designadas de um modo geral por fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600). Apenas 1% das hiperfenilalaninémias são devidas à deficiência em BH₄, sendo classificadas como PKU maligna ou atípica (Scriver CR *et al*, 1995; Erlandsen H e Stevens RC, 1999).

A PKU, identificada em 1932 pelo médico norueguês Asbjørn Følling, em 1932 (Følling A, 1934) foi a primeira alteração genética para a qual foi possível, não só obter um tratamento eficaz, através da modificação de factores externos (Bickel H *et al*, 1953), mas também a primeira a ser diagnosticada com sucesso através do rastreio neonatal (Guthrie R e Susi A, 1963). Cerca de 1 em cada 10.000 nados-vivos Caucasianos apresenta esta deficiência, pelo que esta doença autossómica recessiva representa o erro hereditário mais comum no metabolismo dos aminoácidos. Na década de 80 o gene codificante da fenilalanina hidroxilase (gene *PAH*) foi mapeado (Lidsky AS *et al*, 1985) e clonado (Kwok SC *et al*, 1985) permitindo, a nível mundial, a identificação das mutações e a caracterização das enzimas mutantes. Presentemente é reconhecido que a PKU apresenta uma elevada heterogeneidade fenotípica e mutacional (Scriver CR e Kaufman S, 2001). Na realidade até Agosto de 2007 tinham sido já identificadas no gene *PAH* e registadas na base de dados electrónica da PKU (<http://www.pahdb.mcgill.ca>) 531 mutações causadoras de doença (*disease-causing*).

A obtenção de cristais de formas truncadas da proteína humana (Erlandsen H *et al*, 1997; Erlandsen H *et al*, 1998; Fusetti F *et al*, 1997; Erlandsen H *et al*, 2000; Andersen OA *et al*, 2001; Andersen OA *et al*, 2002) permitiu deduzir a estrutura da forma completa da PAH, contribuindo deste modo para uma melhor caracterização estrutural e funcional da forma selvagem e das formas mutantes responsáveis pela PKU.

2. Hidroxilases de L-aminoácidos aromáticos

A fenilalanina hidroxilase, juntamente com a tirosina hidroxilase (TYH; EC 1.14.16.2) e a triptofano hidroxilase (TPH; EC 1.14.16.4), pertence ao grupo das hidroxilases dos L-aminoácidos aromáticos (AAOHs) os quais apresentam um papel fundamental no metabolismo dos mamíferos. A TPH converte o L-triptofano (L-Trp) em 5-hidroxitriptofano (5-OH-Trp), o primeiro passo na biossíntese do neurotransmissor serotonina. A TYH catalisa a formação de 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a partir da L-Tyr, o passo limitante da biossíntese das catecolaminas dopamina, adrenalina e noradrenalina. A PAH, como referido anteriormente, catalisa a hidroxilação do anel aromático da L-Phe, cujos níveis elevados são tóxicos para o organismo, formando L-Tyr (figura 1).

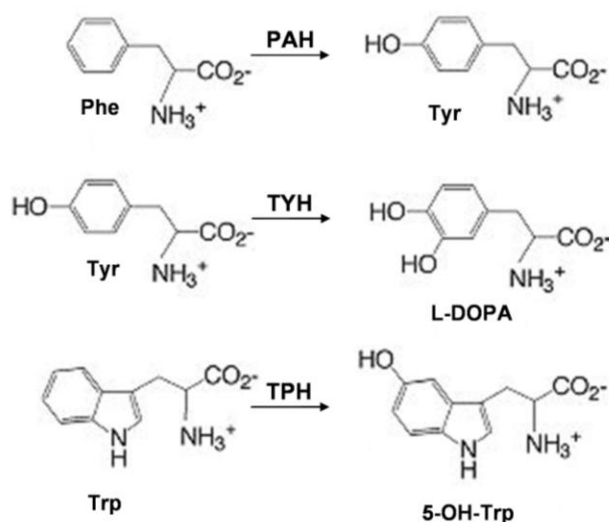


Figura 1 – Hidroxilação dos aminoácidos aromáticos L-fenilalanina (L-Phe), L-tirosina (L-Tyr) e L-triptofano (L-Trp), pelas enzimas fenilalanina hidroxilase (PAH), tirosina hidroxilase (TYH) e triptofano hidroxilase (TPH). (5-OH-Trp) 5-Hidroxitriptofano; (L-DOPA) 3,4-Dihidroxifenilalanina.

As AAOHs são enzimas funcional e estruturalmente semelhantes que terão evoluído a partir de um gene ancestral comum, por duplicação e divergência, há cerca de 75 milhões de anos (Ledley FD *et al*, 1985; Grenett HE *et al*, 1987). De acordo com as estruturas cristalinas obtidas para estas três enzimas a PAH será mais próxima da TPH (Scriver CR e Kaufman S, 2001). As AAOHs utilizam o oxigénio molecular (O_2) para

hidroxilar o substrato aromático na presença do cofactor BH_4 e apresentam no seu centro activo o ião ferro, não hémico, na forma reduzida (Fe^{2+}). A nível funcional as AAOHs diferem entre si essencialmente pela sua especificidade para os diferentes substratos (Flatmark T e Stevens RC, 1999), e pela sua localização tecidual. A PAH é expressa maioritariamente em hepatócitos, embora também seja possível detectar expressão residual nos rins (Lichter-Konecki U *et al*, 1999a,b), melanócitos (Schallreuter KU *et al*, 1994), linfócitos (Devi KS *et al*, 1998) e vilosidades coriónicas (Chelly J *et al*, 1989; Sarkar G e Sommer SS, 1989). A TYH localiza-se em células neuroendócrinas catecolaminérgicas e a TPH é expressa em células indiferenciadas do cérebro e nas células Kulchitsky do epitélio do intestino (células entero-endócrinas) (Hufton SE *et al*, 1995).

A PAH, TYH e TPH são proteínas homotetraméricas, sendo cada monómero constituído por um domínio N-terminal regulador, um domínio catalítico e um domínio C-terminal responsável pela formação dos tetrâmeros. Enquanto que os domínios reguladores N-terminal apresentam diferenças consideráveis, quer no seu tamanho quer na sua topologia, os domínios catalíticos e de tetramerização apresentam uma elevada homologia (cerca de 80% na zona C-terminal). Estas características são reflexo quer dos diferentes modos de regulação, quer do mecanismo catalítico semelhante, apresentados por estas enzimas.

3. A Fenilalanina Hidroxilase Humana

Embora a PAH humana (hPAH) tivesse sido identificada em 1952 (Udenfried S e Cooper JR, 1952) a difícil obtenção de quantidades elevadas desta proteína impediu, durante muitos anos, a sua caracterização. Na realidade, até meados dos anos 80 os poucos estudos efectuados tinham como modelo a PAH de rato (rPAH). Foi a clonagem do cDNA da hPAH (Kwok SC *et al*, 1985) que permitiu efectuar grandes avanços na identificação das propriedades enzimáticas e estruturais desta proteína, uma vez que tornou possível a sua produção em larga escala por expressão heteróloga.

3.1. Características Estruturais

Como referido anteriormente a hPAH é uma proteína homotetramérica (figura 2). Enquanto que em condições fisiológicas os tetrâmeros deverão representar a forma dominante (Kappock TJ *et al*, 1995; Martínez A *et al*, 1995), em solução a hPAH recombinante apresenta-se num equilíbrio de homodímeros e homotetrâmeros, o qual é deslocado na direcção da forma tetramérica após incubação com o substrato L-Phe (Døskeland A *et al*, 1982; Martínez A *et al*, 1995; Knappskog PM *et al*, 1996) ou por diminuição do pH da solução proteica (Knappskog PM *et al*, 1996).

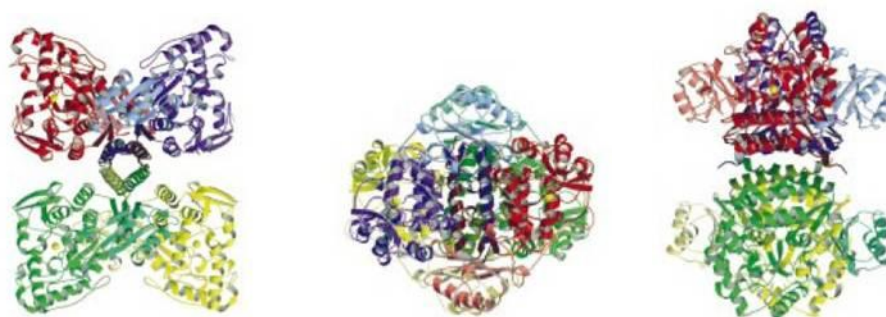


Figura 2- Diferentes perspectivas do modelo da forma tetramérica da fenilalanina hidroxilase. Cada monómero encontra-se representado por uma cor diferente (domínio tetramérico, mais escuro e domínio regulador mais claro. Retirado de Flatmark T and Stevens RC (Flatmark T e Stevens RC, 1999).

Estruturalmente, o monómero da fenilalanina hidroxilase humana é constituído por três domínios: um domínio regulador (resíduos 1-142), um domínio catalítico (resíduos 143-410) e um pequeno domínio responsável pela dimerização e tetramerização (resíduos 411-452) (figura 3).

O domínio regulador é constituído por quatro cadeias β e por duas hélices α pequenas, formando o motivo $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, observado também noutras enzimas com características reguladoras, nomeadamente na fosfoglicerato desidrogenase de *Escherichia coli* (Flatmark T e Stevens RC, 1999). As cadeias β organizam-se numa folha β anti-paralela, ladeada pelas hélices α e pelo domínio catalítico.

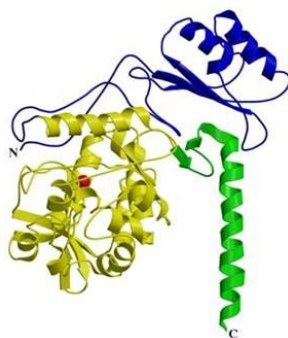


Figura 3 – Modelo de um monómero da forma humana da fenilalanina hidroxilase. O domínio regulador (domínio N-terminal) está representado a azul, o domínio catalítico está representado a amarelo e o domínio responsável pela tetramerização (domínio C-terminal) está representado a verde. A molécula de ferro está representada como uma esfera vermelha. De acordo com Erlandsen H e Stevens RC, 1999.

O domínio N-terminal apresenta ainda uma sequência autoreguladora (ARS; resíduos 2 a 30) que cobre parcialmente a entrada para o sítio activo da enzima (Kobe B *et al*, 1999). No monómero o domínio regulador contacta com o domínio catalítico sendo a interface entre os domínios definida por cerca de 270 interações (Flatmark T e Stevens RC, 1999). Adicionalmente, no dímero, o domínio catalítico de um monómero contacta substancialmente com o domínio regulador do outro monómero, estabelecendo cerca de 104 pontos de contacto (figura 4).



Figura 4 – Representação de um dímero da fenilalanina hidroxilase de rato, evidenciando os pontos de contacto entre o domínio regulador de um monómero e o domínio catalítico do outro monómero. Retirado de Flatmark T e Stevens RC (Flatmark T e Stevens RC, 1999).

O domínio catalítico é composto por 13 hélices α e por 8 cadeias β . O sítio activo consiste numa região aberta, acessível aos solventes e a ligandos exógenos, com cerca de 13 Å de profundidade e 10 Å de largura. Ligado ao centro activo existe um canal de 16 Å de comprimento e 8 Å de largura, através do qual se pensa que o substrato seja conduzido até ao centro activo (Erlandsen H *et al*, 1997). Dos 34 aminoácidos constituintes do centro catalítico, apenas 6 deles não são hidrófobos: três ácidos glutâmicos (Glu), duas histidinas (His) e uma tirosina (Tyr). O átomo de ferro localiza-se no fundo do centro activo, deixando espaço para a ligação do cofactor e do substrato (Figura 5b) e estabelece seis ligações, nomeadamente com a His285, a His290, um átomo de oxigénio do resíduo Glu330 e três moléculas de água (figura 5A). Os ligandos do ferro estão distribuídos de forma octaédrica, tornando-o hexa-coordenado (Andersen OA *et al*, 2001).

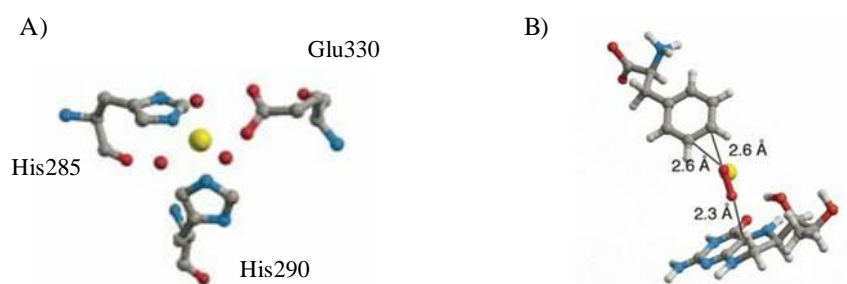


Figura 5 – Estruturas do centro activo. A) Vista dos resíduos coordenados de Ferro; a amarelo está representado o átomo de ferro, a vermelho os átomos de oxigénio da água; a diferente geometria de coordenação do resíduo Glu330 é visível. B) Modelo do complexo catalítico da PAH humana, com as moléculas de L-Phe, BH₄ e O₂ (a vermelho) ligadas, formando um complexo ferro-peroxi. De acordo com Teigen K *et al*, 1999.

O domínio de tetramerização é constituído por um braço C-terminal composto por duas cadeias β e uma hélice α longa. O braço de cada monómero estende-se até ao monómero mais próximo, fazendo com que as quatro hélices α , uma de cada subunidade do tetrâmero, se liguem de forma antiparalela no centro da estrutura (Erlandsen H e Flatmark T, 1998) (figura 6).



Figura 6 – Pormenor da estrutura do domínio de tetramerização da fenilalanina hidroxilase. Cada sub-unidade encontra-se representada por uma cor diferente. Retirado de Flatmark e Stevens RC (Flatmark T e Stevens RC, 1999).

A forma tetramérica da hPAH é constituída por dois dímeros conformacionalmente distintos (AC e BD, figura 7) sendo por isso considerada um dímero de dímeros. O tetrâmero da fenilalanina hidroxilase apresenta um eixo de simetria cristalográfico entre as subunidades A, B e C, D, respectivamente, e um eixo não cristalográfico que relaciona o dímero AC ao dímero BD (figura 7).

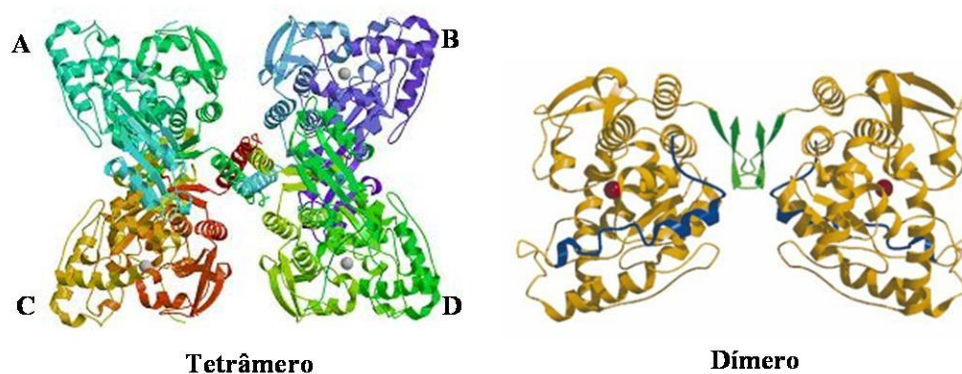


Figura 7 – Formas oligoméricas da fenilalanina hidroxilase humana. O tetrâmero, onde cada sub-unidade está representada com uma cor diferente, é constituído por um dímero de dímeros, AC e BD, respectivamente. No dímero a porção C-terminal do domínio regulador (resíduos 1-142) está representado a azul, o domínio catalítico (resíduos 143-410) a amarelo e a parte N-terminal do domínio de tetramerização (resíduos 411-424) a verde. Imagem do tetrâmero retirada de Erlandsen H e Stevens RC, 1999 e imagem do dímero retirada de Flatmark T e Stevens RC, 1999.

3.2. Mecanismo catalítico

A reacção de hidroxilação da fenilalanina, mediada pela hPAH, processa-se na presença de O_2 (Hufton SE *et al*, 1998; Fusetti F *et al*, 1998) e do cofactor de natureza não proteica BH_4 , o qual é regenerado pela di-hidropterina reductase (DHPR) (Kaufman S, 1993; Hufton SE *et al*, 1995; Erlandsen H e Stevens RC, 1999). A reacção catalítica consiste na quebra da ligação do di-oxigénio, sendo um dos átomos de oxigénio incorporado no cofactor, formando o intermediário 4-hidroxi-tetrabiopterina (4-OH- BH_4) e o outro átomo incorporado na L-Phe, dando origem ao produto L-Tyr (figura 8).

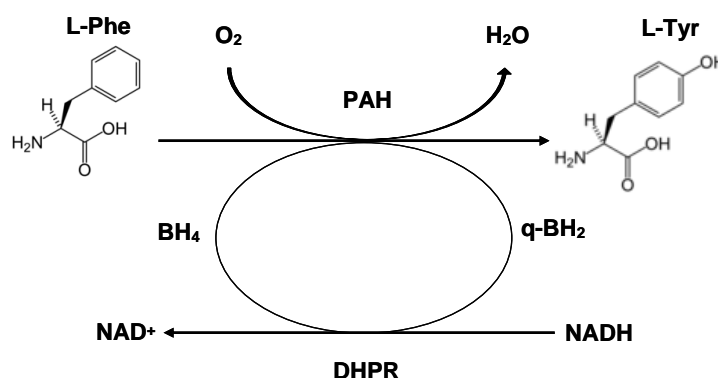


Figura 8 - Sistema de hidroxilação hepática da fenilalanina (L-Phe) mediada pela fenilalanina hidroxilase (PAH). (L-Phe) L-fenilalanina; (L-Tyr) L-tirosina; (BH_4) tetra-hidrobiopterina; ($q-BH_2$) di-hidropterina quinonóide; (DHPR) di-hidropterina reductase; (NAD^+) dinucleótido de nicotinamida oxidado; ($NADH$) dinucleótido de nicotinamida reduzido.

O cofactor BH_4 é ainda indispensável para a pré-redução do ferro na sua forma cataliticamente activa de $Fe(II)$ (Figura 9, passo 1). Embora se encontre ainda por esclarecer este mecanismo de redução (Kappock TJ e Caradonna JP, 1996), sabe-se que este passo não participa no processo catalítico normal. Após redução, a PAH cataliticamente activa reverte para a sua forma inactiva, oxidada, a uma taxa de *turnover* lenta (Wallick D, 1985). Controlos efectuados utilizando L-Phe como substrato demonstraram que por cada 200 *turnovers* da enzima PAH, apenas ocorre uma reversão do ferro ao estado férrico (Dix TA e Benkovic SJ, 1985).

A recente obtenção de cristais de complexos ternários do domínio catalítico da hPAH - hPAH- $Fe(II)$ - BH_4 (Andersen OA *et al*, 2001 e 2002) e hPAH- $Fe(II)$ - BH_4 -

análogos da L-Phe (Andersen OA *et al*, 2003) - contribuiu para uma melhor compreensão do mecanismo catalítico da hPAH. Deste modo, postula-se que a enzima apresente locais específicos de ligação ao substrato, ao cofactor e ao di-oxigénio e que o ferro terá um papel activo na incorporação do oxigénio. Contrariamente ao que é observado na enzima procariota, onde o mecanismo de hidroxilação parece ser sequencial (Volner A *et al*, 2003), na PAH dos mamíferos a ligação dos substratos e a libertação de produtos deverá ser aleatória (Costas M *et al*, 2004).

No mecanismo catalítico proposto o cofactor dever-se-á ligar à enzima PAH pré-reduzida, dando origem a um ferro hexa-coordenado com três moléculas de água ligadas (Erlandsen H *et al*, 2000; Andersen OA *et al*, 2001) (figura 9, passo2). A ligação de uma molécula de L-Phe ao complexo e consequente perda de duas moléculas de água conduz a um rearranjo desta estrutura, onde a orientação do resíduo Glu330 é alterada e o átomo de ferro apresenta um arranjo piramidal penta-coordenado (Andersen OA *et al*, 2002), libertando um sítio de coordenação para a activação pelo di-oxigénio (figura 9, passo 3). Seguidamente ocorre a ligação do di-oxigénio ao ferro, formando um possível intermediário Fe(II)-O-O-BH_4 (Dix TA *et al*, 1985) (figura 9, passo 4). A heterólise da ligação O-O origina um cofactor hidroxilado ($4a\text{-OH-BH}_4$) e um intermediário Fe(IV)=O , altamente reactivo (Dix TA e Benkovic S, 1985; Bassan A *et al*, 2003) (Figura 9, passo5), capaz de incorporar um átomo de oxigénio no anel aromático da L-Phe, formando L-Tyr (figura 9, passo 6). O mecanismo de libertação do produto da reacção do centro activo não se encontra totalmente esclarecido tendo sido propostos dois modelos. Tendo em conta a configuração característica da $4a\text{-OH-BH}_4$ formada no processo catalítico, esta poderá interagir com o resíduo Phe254, resultando numa baixa afinidade do centro activo para o complexo formado, originando a libertação da L-Tyr (Teigen K *et al*, 1999). Alternativamente, a tirosina poderá ser libertada devido a impedimentos estéricos com os resíduos Glu330 e Trp326 (Andersen OA *et al*, 2002; Teigen K *et al*, 1999).

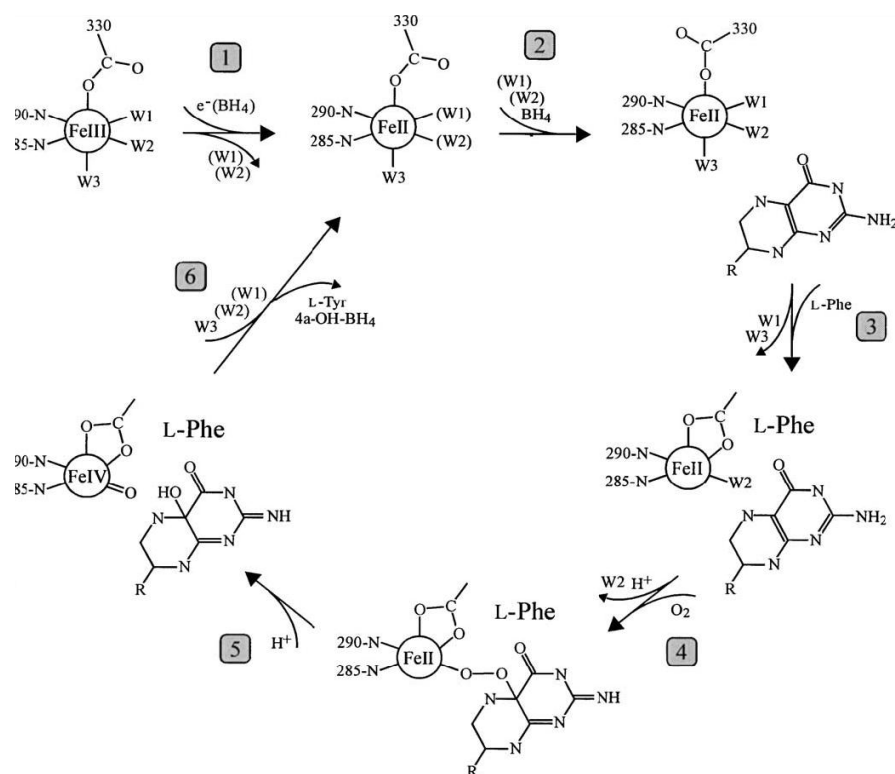


Figura 9 – Mecanismo catalítico proposto para a hidroxilação da L-Phe pela enzima PAH. De acordo com Andersen OA *et al*, 2002.

3.3. Propriedades enzimáticas

A fenilalanina hidroxilase humana tem sido considerada uma proteína instável, uma vez que após purificação perde rapidamente a sua actividade catalítica. Como referido anteriormente, a hPAH existe num delicado equilíbrio dímero \rightleftharpoons tetrâmero, que é deslocado para a forma tetramérica na presença de L-Phe. Embora ambas as formas sejam cataliticamente activas, sabe-se presentemente que as suas propriedades enzimáticas apresentam diferenças substanciais. (Bjorgo E *et al*, 2001).

A forma tetramérica da hPAH recombinante apresenta uma maior eficiência catalítica, uma cooperatividade positiva para a L-Phe ($h = 1,6$) na presença do cofactor natural, activação pela pré-incubação com L-Phe (5 a 6 vezes) e uma maior afinidade para a L-Phe (Bjorgo E *et al*, 2001). Comparativamente, a forma dimérica possui apenas 35% da eficiência catalítica da forma tetramérica, revela uma ausência de cooperatividade na presença de BH_4 e uma activação por pré-incubação com o substrato de apenas 1,6 vezes. É de referir que, quando comparada com a rPAH o aumento de actividade hidroxilativa da hPAH pela pré-activação pela L-Phe é modesto, uma vez

que a enzima humana, ao contrário da enzima do rato, se encontra num estado parcialmente activado (Kowlessur D *et al*, 1996).

De um modo geral, nas enzimas, o fenómeno de cooperatividade positiva significa que a ligação do ligando induz uma alteração sequencial, causando uma modificação conformacional que é transmitida às subunidades vizinhas, facilitando a subsequente ligação às restantes subunidades (Koshland DE e Hamadani K, 2002). Na hPAH a dependência sigmoideal em relação à concentração de L-Phe (Shiman R e Gray DW, 1980) reflecte uma transição reversível da enzima, de um estado de baixa afinidade e actividade (forma T) para um estado de elevada afinidade e actividade (forma R), característico de uma enzima histerética, ou seja, uma enzima que responde lentamente a alterações rápidas na concentração dos ligandos. Esta propriedade é de grande importância na regulação enzimática de processos metabólicos complexos (Frieden C, 1970).

O mecanismo molecular do fenómeno de cooperatividade positiva observado para a hPAH não está ainda completamente esclarecido. Resultados obtidos utilizando calorimetria diferencial de varrimento (Thórólfsson M *et al*, 2002) parecem indicar que existe apenas um local de ligação à L-Phe no centro activo da enzima, excluindo assim a hipótese de haver um local adicional específico de ligação ao substrato no domínio regulador. Deste modo, a activação da hPAH resultará da ligação da L-Phe ao centro activo o que desencadeará uma sequência de alterações conformacionais no domínio catalítico, que se propagarão a toda a subunidade. Estas alterações conformacionais no domínio catalítico estão relacionadas com regiões específicas neste domínio, que actuam como “dobradiças” (*hinge-bending*). Cristalograficamente encontram-se definidas 4 regiões *hinge-bending* e que compreendem os resíduos 31-34 (ligação à ARS), resíduos 111-117 (*loop* que liga o domínio regulador ao domínio catalítico), resíduos 218-226 (no domínio catalítico) e resíduos 425-429 (uma estrutura em *loop* intra-domínios que liga o motivo de dimerização ao de tetramerização). Estas zonas, aquando da ligação do substrato, são flexíveis, fazendo com que as alterações conformacionais se propaguem a todo o protómero (Stokka AJ *et al*, 2004). É de realçar que mutações nestas regiões são passíveis de provocar alterações a nível da ligação do substrato à enzima. Como consequência imediata da ligação do substrato, o domínio regulador, que cobre o domínio catalítico, é deslocado ocorrendo simultaneamente um fortalecimento das ligações dos dímeros, o que implica um aumento do volume da proteína na forma tetramérica (Fusetti F *et al*, 1998), sendo observado um aumento da

hidrofobicidade da proteína, uma maior susceptibilidade à proteólise limitada (Phillips RS *et al*, 1983) e uma maior exposição dos resíduos de Trp ao solvente (deslocamento do comprimento de onda de emissão de 340 nm para 350 nm). É de realçar que o fenómeno de cooperatividade positiva da hPAH em resposta à concentração de L-Phe é muito importante, pois actua como mecanismo de manutenção da homeostase da L-Phe no sangue (Thóroúlfsson M *et al*, 2003).

A resposta da hPAH a concentrações crescentes de BH₄ é hiperbólica e não sigmoide, como acontece em relação ao substrato. A afinidade para o cofactor natural é 5-6 vezes superior, quando comparado com a L-Phe, assim com a $V_{máx}$ é também mais elevada. A BH₄ inibe a indução pela L-Phe. No entanto, elevadas concentrações de substrato revertem a conformação de baixa actividade catalítica que a hPAH apresenta quando associada à BH₄. *In vitro*, a adição de BH₄ induz uma modificação na hPAH, tornando-a mais compacta e com menor susceptibilidade à proteólise limitada pela tripsina (Solstad T *et al*, 2003; Phillips RS *et al*, 1983).

Na presença do cofactor sintético 6-metil-tetra-hidropterina (6-MPH₄) e mesmo sem pré-activação pela fenilalanina, a velocidade da reacção de hidroxilação é maior (actividades absolutas mais elevadas), sendo por isso usual utilizar esta molécula aquando da determinação de actividades enzimáticas da hPAH.

A PAH apresenta um valor de $S_{0,5}$ para a fenilalanina, determinado em presença de BH₄, que ronda os 50 μ M (Ledley FD *et al*, 1987; Kowlessur D *et al*, 1996), valor próximo do considerado como normal para a fenilalanina plasmática.

3.4. Propriedades físico-químicas

O protómero da hPAH é constituído por 452 aminoácidos, apresentando uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa (50 – 53 kDa) (Kappock TJ e Caradonna JP, 1996) e um ponto isoeléctrico (pI) de 5,0-5,2 (Petruschka L *et al*, 1990).

Até à data, são ainda escassos os conhecimentos acerca das propriedades termodinâmicas da proteína hPAH. Kleppe e colaboradores (Kleppe R *et al*, 1999) demonstraram que a desnaturação da enzima ocorre através de um modelo de três estados. Recorrendo ao método de extrapolação linear (Pace CN, 1986), estes autores determinaram a energia livre de Gibbs na ausência de desnaturante (ΔG^{H_2O}), a

concentração de desnaturante que provoca 50% de desnaturação (C_m) para os diferentes estados de transição e ainda o parâmetro m , uma medida da dependência do ΔG^{H_2O} em relação à concentração de desnaturante, o que segundo alguns autores (Greene RF e Pace CN, 1974; Shortle D, 1995) está directamente relacionado com o número de aminoácidos exposto ao solvente durante o processo de desnaturação.

Na ausência de substrato e em condições moderadamente desnaturantes (1 - 4 M de ureia), a enzima hPAH apresenta uma elevada tendência para a formação de agregados não covalentes. A realização de ensaios de *quenching* permitiu demonstrar que a proteína não sofre alterações significativas na acessibilidade dos resíduos de triptofano a baixas concentrações de ureia. No entanto, para concentrações elevadas, acima de 6,5 M há uma exposição gradual dos resíduos de Trp (Kleppe R *et al*, 1999). A presença de agentes desnaturantes também influencia a conformação oligomérica da proteína, verificando-se que ocorre uma dissociação gradual da forma tetramérica nativa para formas diméricas e monoméricas não nativas (Kleppe R *et al*, 1999).

3.5. Modificações pós-tradução

In vivo a hPAH é fosforilada, no resíduo de Ser16, pela proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (Døskeland AP *et al*, 1996). A fosforilação da hPAH induz um incremento na actividade basal de aproximadamente 1,6 vezes, uma diminuição do valor de $S_{0,5}$ para a L-Phe, um aumento do conteúdo de hélices- α (Miranda FF, 2002) e uma ligeira protecção à proteólise limitada (Døskeland AP *et al*, 1996).

A desamidação não enzimática é outra das modificações pós-tradução à qual a hPAH está sujeita. *In vivo*, este processo, deverá reflectir o “envelhecimento” proteico, marcando a proteína para a sua degradação. A desamidação consiste na hidrólise dos grupos amida de resíduos de aminoácidos. A Asn e a Gln são os aminoácidos mais susceptíveis de sofrer desamidação originando Asp e Glu, respectivamente. O pH do meio, a temperatura e a própria conformação proteica (estruturas mais abertas) potenciam este processo que poderá levar à formação de proteínas com características funcionais diferentes. Relativamente à hPAH, a sua desamidação ocorre preferencialmente nos resíduos de Asn32, Asn376 e Asn133, originando uma proteína com características enzimáticas ligeiramente diferentes. Deste modo, a hPAH

desamidada apresenta um aumento: (1) na afinidade para a L-Phe; (2) no K_m para a BH_4 ; (3) na eficiência catalítica; (4) na inibição pelo substrato e (5) no coeficiente de Hill (h). Ensaio de proteólise limitada com a tripsina indicam que, a forma desamidada dever-se-á apresentar numa conformação mais aberta uma vez que é menos resistente à proteólise (Carvalho RN *et al*, 2003).

3.6. Função fisiológica

A hPAH é uma enzima fundamental no controlo dos níveis de L-Phe circulante, que no Homem são de aproximadamente $58 \pm 15 \mu M$ (Scriver CR e Kaufman S, 2001). A manutenção destes valores é conseguida essencialmente através de um controlo rigoroso da metabolização deste aminoácido uma vez que o seu aporte ocorre principalmente através da dieta.

São conhecidas três vias de degradação da fenilalanina: a hidroxilação, a transaminação e a descarboxilação (figura 10). A hidroxilação, mediada pela hPAH, é o processo mais relevante e conduz à oxidação completa da fenilalanina com formação de dióxido de carbono e água (figura 10, passo 1). Adicionalmente, contribui para a produção de um composto cetogénico (acetoacetato), de um composto gluconeogénico (fumarato) e ainda para o fornecimento do aminoácido L-Tyr.

O bloqueio da principal via de catabolização da L-Phe (reação de hidroxilação) origina uma acumulação daquele aminoácido o que por sua vez activa as vias de degradação alternativas de transaminação (figura 10, passo 2) ou descarboxilação (figura 10, passo 3), esta última pouco relevante no Homem. A via de transaminação, que não conduz à degradação completa da L-Phe, tem como produto inicial o fenilpiruvato.

In vivo, a hPAH está sujeita a um processo de regulação complexo. A actividade desta enzima pode ser regulada por fosforilação pela PKA (parágrafo 3.5.) e pelo substrato L-Phe. A fosforilação da PAH e outras enzimas ocorre no fígado, e causa a estimulação da gluconeogénese e a inibição da glicólise, o que leva a uma rápida queda dos níveis de L-Phe no sangue, devido a activação alostérica da enzima pelo seu substrato (a L-Phe) (Kappock TJ e Caradonna JP, 1996).

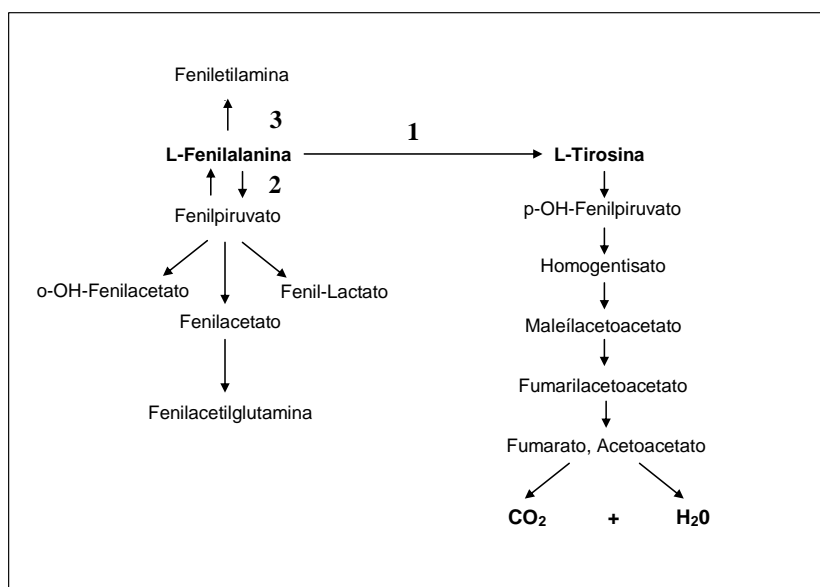


Figura 10 - Vias de metabolização de L-fenilalanina. (1) Reacção de hidroxilação catalisada pela fenilalanina hidroxilase; (2) reacção de transaminação; (3) reacção de descarboxilação.

4. Deficiência na Fenilalanina Hidroxilase Humana

4.1. O gene *PAH*

O gene que codifica para a enzima PAH localiza-se no cromossoma 12, braço q, banda 24.1 (12q24.1) (Lidsky AS *et al*, 1985). É um gene extenso, cobrindo cerca de 100 kb de DNA genómico. É constituído por 13 exões, com dimensões entre 57 e 892 pb separados por 12 intrões que variam entre 1 e 23 kb. Todos os locais de *splicing* têm em comum o facto de no início e no fim apresentarem os dinucleótidos GT e AG, respectivamente. A razão entre as zonas codificantes e as não codificantes é das mais baixas entre os genes eucarióticos conhecidos, o que contribuirá para a sua natureza polimórfica (Dilella AG *et al*, 1986).

Em 1985, Kwok e colaboradores (Kwok SC *et al*, 1985) isolaram e clonaram um cDNA completo (*full-length*) da fenilalanina hidroxilase humana (phPAH247; referência de acesso: GenBank [U49897](#); anexo I) constituído por 2680 bp. O phPAH247 inclui o codão de iniciação da tradução ATG (posição 473) e o codão de terminação TAA (posição 1831), sendo transcrito num mRNA de cerca de 2226 bp (Konecki DS *et al* 1992). A região 3' não traduzida, constituída por cerca de 868 pb, apresenta vários

codões de terminação e três sequências AATAAA importantes no processamento do RNA incluindo a sua adenilação (Proudfoot NJ e Brownlee GG, 1976).

Presentemente a estrutura da região 5' deste gene encontra-se bem caracterizada (Konecki DS *et al*, 1992). Foi assim confirmado que a PAH é uma enzima finamente regulada por mecanismos de controlo da transcrição. A região promotora apresenta cinco potenciais locais de transcrição (CAP *sites*) no exão 1, a montante do codão ATG de iniciação, não apresenta nenhuma sequência TATA na região proximal, mas possui vários elementos *Cis*-actantes (quatro sequências GC e uma sequência CCAAT) que poderão constituir um alvo para a regulação da eficiência de transcrição. A detecção de dois potenciais sítios GRE (*glucocorticoid response element*) revelou-se de grande interesse, dado o conhecido efeito dos glucocorticóides na actividade enzimática da PAH (Dahl HH e Mercer JF, 1986). Estudos realizados em ratos transgénicos demonstraram que a região 5' confere ao gene *PAH* um padrão específico de expressão, quer em termos de expressão tecidular, quer relativamente ao desenvolvimento ontológico (Wang Y *et al*, 1992).

4.2. Variantes alélicas no gene *PAH*: alelos patogénicos

O gene *PAH* apresenta um grande número de variantes alélicas (mutações), quer a nível da sua sequência nucleotídica exónica, quer a nível das regiões não codificantes (Lidsky AS *et al*, 1985b; DiLella AG *et al*, 1986; Speer A *et al*, 1986). Estas podem ser classificadas como polimórficas (sem expressão fenotípica) ou patogénicas (com expressão fenotípica).

Actualmente foram já identificadas mais de 500 mutações patogénicas (*disease-causing*) no gene *PAH* (531 mutações até Agosto de 2007; www.pahdb.mcgill.ca). Estas alterações incluem mutações pontuais (do tipo *missense*, *nonsense* e de *splicing*), deleções e inserções. A maioria das mutações pontuais localizam-se na região compreendida entre o exão 5 e o exão 12 (resíduos 148 a 438) e que codifica para o domínio catalítico da enzima.

A nível mundial a distribuição da frequência dos alelos patogénicos no *locus PAH* apresenta dois padrões. Nas diferentes populações estudadas apenas um número reduzido de alelos mutantes *PAH*, nomeadamente as mutações R408W, IVS10-11G>A, I65T e R261Q são prevalentes, sendo os restantes raros. No entanto, a sua distribuição geográfica e por população não são aleatórias. Por exemplo, em Portugal os alelos *PAH*

patogénicos mais frequentes incluem as mutações V388M e R270K, que contudo apresentam a nível mundial uma frequência baixa. Deste modo, determinado alelo reflecte a história da população onde é detectado, o que do ponto de vista da genética de populações é muito importante.

As mutações responsáveis pela HPA ou PKU podem ser classificadas de acordo com a localização estrutural dos resíduos afectados ou tendo em conta as características enzimáticas/bioquímicas da proteína mutada. Assim, e de acordo com a primeira classificação as mutações podem ser agrupadas em cinco categorias distintas, as que afectam os resíduos: (1) localizados no centro activo; (2) estruturais; (3) responsáveis pela interacção entre os diferentes domínios (num monómero); (4) que interagem com a sequência reguladora N-terminal; e (5) localizados na interface dos dímeros ou dos tetrâmeros (Eisensmith RC e Woo RL, 1991). Tendo em conta o comportamento cinético e/ou a estabilidade das proteínas mutantes foram identificados três grupos de mutações: (1) as que afectam as propriedades cinéticas e a estabilidade da enzima; (2) as que conduzem a formas estruturalmente estáveis, mas cineticamente afectadas; (3) as que originam proteínas com características cinéticas normais, mas com estabilidade *in vitro* e *in vivo* reduzida (Erlandsen H e Stevens RC, 1999).

Presentemente, a PKU e as HPAs com ela relacionadas podem ser consideradas “doenças conformacionais”, uma vez que a maioria das mutações afectam o *folding* proteico, aumentando por isso os fenómenos de agregação e/ou degradação proteolítica (Leandro P *et al*, 2001). *In vivo* este fenómeno origina uma diminuição da actividade residual da hPAH, ainda que a proteína não apresente mutações que alterem directamente as suas propriedades enzimáticas.

4.3. Fenótipos associados

A deficiência em PAH manifesta-se a nível enzimático, metabólico e clínico. O fenótipo enzimático só pode ser estabelecido através da determinação da actividade enzimática da PAH nos indivíduos afectados. Uma vez que esta enzima é expressa maioritariamente no hepatócito (Bartholomé K *et al*, 1975), raramente é determinado o fenótipo enzimático já que estes ensaios envolvem a realização de uma biópsia hepática. A actividade enzimática de indivíduos portadores das várias formas de HPA varia entre 1 a 35% da actividade enzimática observada em indivíduos normais.

O fenótipo metabólico é avaliado através da determinação dos níveis de hiperfenilalaninémia, a qual é condição necessária, mas não suficiente, para explicar a neurotoxicidade a nível do desenvolvimento e função cerebrais (Agrawal HC *et al*, 1970). O fenótipo metabólico é dividido em três variantes, de acordo com os níveis de L-Phe antes do início do tratamento e com a tolerância dietética em L-Phe (Güttler F e Guldberg P, 1994). Deste modo, esta patologia é dividida em PKU clássica, PKU moderada e PKU suave. A forma mais grave da doença é a PKU clássica e a PKU suave corresponde à forma mais atenuada.

A nível clínico distinguem-se duas entidades fenotípicas distintas: a HPA do tipo PKU e a do tipo não-PKU. A primeira apresenta sempre manifestações clínicas mais acentuadas e uma tolerância à L-Phe diminuta. Os doentes com fenótipo do tipo não-PKU apresentam uma condição geralmente benigna, permitindo um desenvolvimento intelectual normal, sem necessidade de tratamento dietético.

Nos últimos anos o estabelecimento de correlações fenótipo-genótipo tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para antecipação do fenótipo clínico dos doentes com deficiência em PAH (Okano Y *et al*, 1991). No entanto, o estabelecimento desta correlação não se encontra isenta de dificuldades. Estas prendem-se não só com o elevado número de mutações identificadas, mas essencialmente com o facto de a maioria dos doentes serem compostos heterozigóticos, ou seja apresentarem dois alelos *PAH* mutantes diferentes. A elevada diversidade genotípica reflecte-se num espectro fenotípico quase contínuo cobrindo desde as formas benignas, sem necessidade de terapia, até às formas mais graves que obrigam a uma restrição dietética acentuada.

Embora os fenótipos metabólicos e enzimáticos de grande número de formas PKU possam ser antecipados através dos estudos de expressão *in vitro* das proteínas PAH mutantes (Okano Y *et al*, 1991; Knappskog M *et al*, 1993; Eiken HG *et al*, 1996), tem-se verificado algumas situações de ausência de correlação entre a capacidade de hidroxilação prevista e o fenótipo metabólico e, sobretudo, o fenótipo clínico. Este facto pode ser explicado pela natureza multifactorial da HPA. Assim, o fenótipo apresentado pelo doente pode ser resultado, não só do genótipo, mas também de factores ambientais, pelo fenómeno de complementação inter-alélica negativa (Leandro J *et al*, 2006) ou pelo efeito de outros *loci*.

A ausência de correlação entre o genótipo e o fenótipo observada não só na deficiência em PAH mas também noutras doenças genéticas poderá ainda ser explicada pela presença de mutações, mesmo que situadas em regiões não conotadas com

sequências de consenso para os mecanismos de *splicing*, que induzem mecanismos de *splicing* alternativos, traduzindo-se na presença de vários transcritos diferentes (Ellingsen S *et al*, 1999).

4.4. Patogénese

Na ausência de tratamento, a PKU é considerada uma patologia grave, sendo que nesta situação as manifestações clínicas da doença incluem fundamentalmente uma disfunção cerebral (microcefalia, atraso mental severo e irreversível e epilepsia) e alterações das capacidades motoras. De um modo geral, estes doentes apresentam a pele e os cabelos claros, uma vez que a diminuição dos níveis de Tyr circulante irá comprometer a biossíntese de melanina.

O elevado impacto da PKU a nível do sistema nervoso central (SNC) encontra-se directamente relacionado com o sistema de transporte dos *large neutral aminoacids* (LNAA; Phe, Tyr, Trp, Thr, Leu, Ile, Val, Met e His) através da barreira hemato-encefálica. O transporte dos LNAA é mediado pelo sistema de transporte de LNAA (LAT). Presentemente, foram já isoladas quatro formas destas proteínas nomeadamente a LAT1, 2, 3 e 4, sendo que a LAT1 é expressa selectivamente na barreira hemato-encefálica e apresenta uma elevada afinidade para os LNAA (Kanai Y e Endou H, 2003). Uma vez que a Tyr, o Trp e a Phe utilizam o mesmo transportador, o aumento de L-Phe no plasma irá originar uma competição com o transporte de Tyr e de Trp, através da barreira hemato-encefálica. Assim, no sistema nervoso central a HPA exerce o seu efeito neuro-tóxico directamente porque compromete a síntese de mielina e indirectamente porque leva a uma depleção dos níveis de Tyr e Trp e consequentemente a uma diminuição da síntese de serotonina e das catecolaminas. Dados recentes indicam que os doentes não sujeitos a tratamento desenvolvem uma leucodistrofia, ou seja uma degeneração progressiva da matéria branca do cérebro (Huttenlocher PR, 2000).

4.5. Rastreio e diagnóstico

A PKU e HPAs reúnem os requisitos da Organização Mundial da Saúde que permitiram a implementação do seu rastreio na população de recém-nascidos (Kerruish NJ e Robertson SP, 2005) ou seja: (1) é uma doença que, se não for tratada, traz graves consequências para a saúde; (2) existe um tratamento que modifica a história natural da doença e que é significativamente mais eficaz se implementado o mais cedo possível após o nascimento; (3) existe um teste de triagem que é simples, eficiente, aplicável em larga escala e de baixo custo; e (4) a elevada frequência da patologia.

Os testes de rastreio utilizados mais frequentemente determinam os níveis de fenilalanina no sangue. De entre estes salientamos o método microbiológico de Guthrie e Susi (Guthrie R e Susi A, 1963), por ter sido o primeiro teste a ser aplicado no rastreio neo-natal. Em Portugal o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce da PKU foi instaurado em 1979 e, presentemente, é efectuado entre o quarto e quinto dia de vida. Todos os recém-nascidos que apresentem valores de fenilalanina plasmática acima de 2 mg/100 mL (120 μ M) são convocados para confirmação. Caso se confirme a presença de uma hiperfenilalaninémia, com valores acima de 6 mg/100 mL (350 μ M) é iniciado o tratamento. Os recém-nascidos que mantiverem os valores de fenilalanina plasmática entre 2 e 6 mg/mL são mantidas sob vigilância. Convém salientar que todos os doentes diagnosticados com uma hiperfenilalaninémia persistente são ainda rastreados para a presença de uma deficiência na síntese ou regeneração do cofactor BH₄ (por determinação da actividade da DHPR e dos níveis de metabolitos pterínicos urinários) de modo a excluir uma situação de PKU maligna ou atípica.

4.6. Tratamento

O tratamento da PKU e HPAs assenta no controlo do nível de fenilalanina no sangue o qual deverá ser mantido próximo dos valores normais. De modo a prevenir danos cerebrais irreversíveis o tratamento deve ser iniciado no período neo-natal e dever-se-á manter durante a vida (Surtees R e Blau N, 2000), uma vez que vários estudos demonstram que a interrupção do tratamento, em doentes com a forma clássica da doença, conduz ao reaparecimento de alterações na estrutura e função cerebral (Scriver CR e Kaufman S, 2001).

A terapia dietética representa o tratamento universalmente instituído. A dieta consiste numa restrição à ingestão de L-Phe (restrição dietética). No entanto, nesta terapia, a limitação do consumo de proteínas (principal fonte de L-Phe) conduz a uma depleção de aminoácidos essenciais, ácidos gordos e outros nutrientes, a qual é obviada através da administração de suplementos ricos em aminoácidos e nos nutrientes deficitários (Scriver CR, 1971; Acosta PB *et al*, 1983). Uma das grandes desvantagens da terapia dietética consiste na difícil adesão por parte dos doentes, uma vez que para além de ser uma dieta muito restritiva, os substitutos alimentares têm geralmente um sabor desagradável. Estes factos contribuem para que a deficiência em PAH apresente um elevado peso social, agravado em determinadas fases da vida, nomeadamente na adolescência. Deste modo, nos últimos anos têm sido desenvolvidas novas abordagens terapêuticas em alternativa ao tratamento dietético.

A recente observação de que numa elevada percentagem de doentes PKU os níveis plasmáticos de L-Phe diminuía após a administração do cofactor BH₄ (Erlandsen H *et al*, 2004), levou à sua utilização como adjuvante da terapia dietética. Pensa-se que na presença de concentrações elevadas de BH₄ a enzima aumentará a afinidade para o cofactor, resultando num aumento da sua actividade. No entanto, este tratamento é muito dispendioso, implica várias tomas ao dia e só é eficaz nos doentes com PKU moderada.

A terapia enzimática de substituição com a enzima fenilalanina amónia liase (PAL; EC 4.3.1.5) encontra-se em fase de desenvolvimento. A PAL é uma enzima de origem bacteriana que converte a L-Phe em ácido *trans*-cinâmico (que não é tóxico) e amónia. A administração de PAL recombinante (produzida por *Lactococcus lactis*) a ratos com fenótipo PKU mostrou ser eficaz na redução dos níveis circulantes de L-Phe. No entanto, quando administrada oralmente é instável sofrendo degradação e quando administrada por via endovenosa origina reacções imunológicas adversas (Sarkissian CN *et al*, 1999).

À semelhança do que acontece para outras doenças genéticas, também para a PKU a terapia génica tem sido alvo de investigação. A resposta imunitária aos vectores utilizados para a transferência de cDNA para as células alvo e a sua integração no genoma nuclear têm sido os principais motivos que têm impedido o avanço desta técnica (Müllbacher A *et al*, 1989; Ding Z *et al*, 2004).

4.7. Hiperfenilalaninémia materna

A hiperfenilalaninémia materna é uma embriopatia/fetopatia que surge como consequência do excesso de fenilalanina intrauterina (Levy HL e Ghavami M, 1996) e que se traduz em malformações congénitas como microcefalia, cardiomiopatia e atraso no desenvolvimento cognitivo. Todas as mulheres com HPA, em idade reprodutiva, deverão assim receber aconselhamento reprodutivo, apoio social e tratamento continuado de modo a manter meticulosamente os níveis normais de L-Phe antes da concepção e durante a gravidez tornando possível o desenvolvimento normal do feto.

II. ***DESENVOLVIMENTO*** ***EXPERIMENTAL***

II. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

1. INTRODUÇÃO

O trabalho experimental efectuado assentou na caracterização enzimática e estrutural da forma selvagem (hPAHwt) e de formas mutantes da hPAH, tendo como objectivo o desenvolvimento de estratégias de estabilização das proteínas recombinantes quer *in vitro* (hPAHwt e formas mutantes quiméricas) quer *in vivo* (formas hPAH mutantes causadoras de doença). As proteínas hPAH mutantes associadas a fenótipos patogénicos, estudadas foram a I65T (c.194 T→C), R261Q (c.782 G→A), R270K (c.809 G→A) e V388M (c.1162 G→A). As formas mutantes quiméricas produzidas e caracterizadas foram a C29D (c.85 T→G, c.86 G→A), C29S (c.86 G→C, c.87 C→G), C284S (c.851 G→C, c.852. C→T), C445S (c.1334 G→C, c.1335 C→G), D145K (c.433 G→A, c.435 C→G), D151K (c.453 G→A, c.455 T→G), E181K (c.541 G→A) e E360K (c.1078 G→A). Para produção das proteínas hPAH em estudo foi utilizado o sistema de expressão procariota pTrcHis previamente validado no laboratório (Leandro P *et al*, 2000). O cDNA selvagem phPAH247 (cDNAwt (Kwok SC *et al*, 1985); referência de acesso: GenBank U 49897; Anexo I para detalhes), constituído por 2200 bp, encontra-se inserido no sítio *Bam*HI do local de clonagem múltiplo (*Multiple Cloning Site*; MCS) da forma B do vector pTrcHis (pTrcHisB), em fase com o codão ATG (iniciador da tradução) do vector de expressão (*construct* pTrcHis-PAHwt). Os *constructs* mutantes pTrcHis-I65T, pTrcHis-R261Q, pTrcHis-R270K e pTrcHis-V388M encontravam-se já disponíveis no laboratório tendo sido obtidos de acordo com o descrito por Leandro e colaboradores (Leandro P *et al*, 2000; Leandro P *et al*, 2001). Os *constructs* mutantes pTrcHis-C29D, pTrcHis-C29S, pTrcHis-C284S, pTrcHis-C445S, pTrcHis-D145K, pTrcHis-D151K, pTrcHis-E181K e pTrcHis-E360K foram obtidos no decurso deste trabalho.

Nos ensaios efectuados foram utilizadas as proteínas recombinantes sem remover o péptido de fusão hexahistidil, uma vez que foi demonstrado que a sequência 6xHis não altera as características bioquímicas e propriedades cinéticas da enzima humana (Leandro P *et al*, 2000).

2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA SELVAGEM E FORMAS MUTANTES

2.1. Estirpes de bactérias e vectores

A estirpe de *Escherichia coli* utilizada para a transformação do cDNA proveniente da reacção de mutagénese dirigida foi a XL1-Blue supercompetente (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15Tn10 (tetr)*]), adquirida à Stratagene.

As proteínas PAH recombinantes foram produzidas na estirpe de *E. coli* TOP10 (F', *mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)* Φ80*lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG*) utilizando o sistema de expressão pTrcHis (Invitrogen). Este vector (figura 1; Anexo II) apresenta a montante do MCS: (1) o promotor *trc* (P_{trc}), reconhecido pela RNA polimerase de *E. coli* e que é constituído por parte da sequência do promotor *trp* e parte da sequência do promotor *lac* (*trp-lac*); (2) a sequência do gene *LacI* que assegura uma eficiente repressão do promotor pelo repressor *lac*; (3) a sequência do gene *10* do bacteriófago T7, potenciador da tradução; (4) a sequência de reconhecimento de ligação ao ribossoma (RBS); (5) o codão de iniciação da tradução ATG; (6) uma sequência de seis codões CAT, que codifica para uma pequena sequência peptídica de 6 resíduos de histidina (6xHis *tag*), que possui afinidade para metais; (7) o epítipo Xpress (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) e (8) a sequência codificante do péptido reconhecido pela enterocinase (EK; Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ↓) e que permite a posterior remoção do péptido hexa-histidil da proteína recombinante de fusão. As proteínas produzidas através deste sistema têm, deste modo, um domínio de fusão N-terminal com afinidade para metais, nomeadamente o Níquel (Ni^{2+}), o que permite a sua purificação por cromatografia de afinidade com iões metálicos (*Immobilised Metal Affinity Chromatography*; IMAC). O vector pTrcHis apresenta ainda o gene de resistência à ampicilina (Amp), o que permite a selecção destes vectores utilizando meios de cultura contendo este antibiótico.

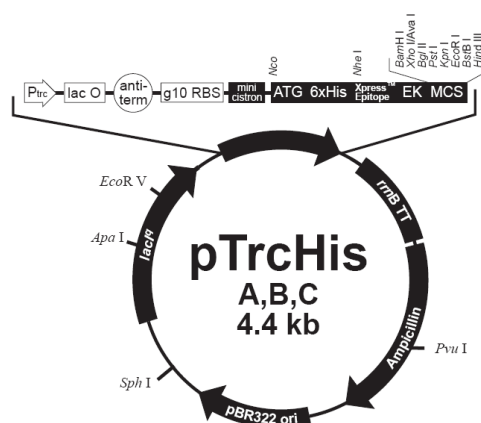


Figura 1 – Representação do vetor pTrcHis (ver texto e anexo II para detalhes). Retirado de http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ptrchis_man.pdf.

Nos ensaios de co-expressão das proteínas hPAH recombinantes com os chaperones moleculares utilizaram-se como células hospedeiras a estirpe de bactérias *E.coli* DH5 α Pro (*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*($r_k^- m_k^+$), *recA1*, *supE44*, *thi-1*, $\Delta(lacZYA-argFV169)$, $\phi 80\delta lacZ\Delta M15$, F^- , λ^- , $P_{N25}/tetR$, $P_{lacI}^q/lacI$, Sp^r), proveniente da Clontech e o sistema de expressão PROTM Bacterial Expression System (Clontech), que inclui os vectores da série pPROLar e pPROTet (ver anexo II). Neste trabalho foi apenas utilizado o vector pPROTet.E, o qual apresenta a origem de replicação *colE1*, o promotor $P_{LtetO-1}$, induzido pela tetraciclina e seus derivados, como por exemplo a anidrotetraciclina (aTc), o epítipo Myc e o gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol (Cm^r). O vector de expressão pROTet tinha sido previamente manipulado de modo a introduzir, após o código de iniciação ATG e antes do MCS, a sequência nucleotídica codificante do péptido hexa-histidil (Leandro J *et al*, 2006).

As proteínas GroESL foram produzidas utilizando o plasmídeo pMPMAG-PEgroE (construído e gentilmente cedido por France Ballivet) (ver anexo II). Este *construct* resultou da clonagem do operão groES-groEL no vector pMPM-A6, entre os locais de restrição *EcoRI* e *HindIII*. O promotor original deste vector foi substituído pelo promotor groE, o qual é induzido pela temperatura (37°C). Este vector contém também um gene de resistência à ampicilina (Amp^r).

Os *constructs* utilizados apresentam assim diferentes marcas de resistência (Amp^r e Cm^r), o que permite a selecção das células transformadas por ambos os vectores num

meio contendo os dois antibióticos e diferentes origens de replicação (ColE1 e P15A) o que permite a replicação de ambos os vectores na célula hospedeira.

2.2. Obtenção das formas mutantes do cDNA PAH

2.2.1 Reacção de mutagénesse dirigida

A reacção de mutagénesse dirigida foi efectuada utilizando o sistema *Quickchange II Site-Direct Mutagenesis* (Stratagene). Este sistema, baseado na técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tem a vantagem de permitir realizar mutações específicas em plasmídeos de cadeia dupla, suprimindo a necessidade de efectuar subclonagens para obter DNA em cadeia simples (DNAss). O DNA plasmídico utilizado como molde deverá ser isolado a partir de uma estirpe *dam+*, sendo amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores (*primers*) contendo a mutação a introduzir e uma polimerase que apresente um baixo nível de inserção de erros durante a reacção de amplificação. O produto amplificado é posteriormente digerido com a enzima *DpnI*, que apenas hidrolisa DNA metilado e hemi-metilado (que só se encontra nas cadeias de DNA parental), o que permite seleccionar apenas o DNA resultante da reacção de PCR e que apresenta a alteração pretendida.

Os oligonucleótidos mutagénicos, sintetizados pela Thermo Electron (Tabela 1), foram desenhados de acordo com os parâmetros óptimos de tamanho, estabilidade de ligação nos terminais 5' e 3' (conteúdo em citosinas (C) e guaninas (G); GC) e temperatura de fusão (T_m). Assim, estes deverão hibridar na mesma sequência (em cadeias opostas), serem constituídos por 25 a 45 bases, apresentarem um T_m igual ou superior a 78°C e possuírem, nas suas extremidades, um conteúdo em GC de cerca de 40%.

A reacção de mutagénesse dirigida foi efectuada num volume final de 50 μ L contendo 1,25 pg de cada oligonucleótido iniciador mutagénico, uma mistura de dNTPs (Roche) numa concentração final de 40 μ M em cada, 10 ng de DNA molde (pTrcHis-hPAHwt) e 2,5 U da DNA polimerase PfuUltra HF (Stratagene). O DNA foi amplificado no termociclador PCR-Express (Hybaid), utilizando o programa 1 (tabela 2), o qual foi desenvolvido considerando o T_m dos oligonucleótidos mutagénicos

utilizados, o tamanho dos fragmentos de DNA a amplificar e o tipo de mutação a introduzir.

Tabela 1 - Oligonucleótidos utilizados nas técnicas de mutagênese dirigida, PCR e sequenciação.

Primers	Sentido	Posição no cDNA ⁽¹⁾	Sequência (5'-3') ⁽²⁾	Técnica
C29S-F	Forward	67-100	GCT ATATT GAAGACAAC <u>T</u> CGAAT CAAAAT GGT GC	Mutagênese dirigida
C29S-R	Reverse	67-100	GGCACCATTTT GATT <u>CG</u> AGTT GT CTTCAATATAGC	Mutagênese dirigida
C29D-F	Forward	67-101	GCT ATATT GAAGACAAC <u>G</u> CAAT CAAAAT GGT GCC	Mutagênese dirigida
C29D-R	Reverse	67-101	GGCACCATTTT GATT <u>G</u> CGTT GT CTTCAATATAGC	Mutagênese dirigida
D145K-F	Forward	418-451	GCGGAACCT GGAT GCT <u>A</u> AGCACCTT GGT TTTAAAG	Mutagênese dirigida e PCR
D145K-R	Reverse	418-451	CTTTAAAACCAAGGGT <u>GCT</u> TAGCAT CCAGT CCGC	Mutagênese dirigida
D151K-F	Forward	437-466	CCCTGGTTT TAA <u>A</u> AGCCT GT GT ACCGT GC	Mutagênese dirigida
D151K-R	Reverse	437-466	GCACGGT ACACAGG <u>CT</u> TTT TAAACCAAGGG	Mutagênese dirigida
E181K-F	Forward	526-561	CGAGT GGAAT ACAT <u>G</u> AAGGAAGAAAAGAAAACAT GG	Mutagênese dirigida
E181K-R	Reverse	526-561	CCAT GTTTTCTTT CTTCCT <u>T</u> CAT GTATTCCACT CG	Mutagênese dirigida
C284S-F	Forward	835-866	CCCGAACCT GACAT CT <u>C</u> T CAT GAGCT GTT GGG	Mutagênese dirigida
C284S-R	Reverse	835-866	CCCAACAGCT CAT <u>G</u> AGAGAT GT CAGGTT CGGG	Mutagênese dirigida
E360K-F	Forward	1065-1098	CAGT ACT GCTTAT CAAAG <u>A</u> AGCCAAAGCTT CT CC	Mutagênese dirigida e PCR
E360K-R	Reverse	1065-1098	GGAGAAGCTTT GGCTTCT <u>T</u> T GAT AAGCAGT ACT G	Mutagênese dirigida
C445S-F	Forward	1318-1347	GAAATT GGAAT CCTTT <u>CG</u> AGT GCCCT CCAG	Mutagênese Dirigida
C445S-R	Reverse	1318-1347	CTGGAGGGCACT <u>CG</u> AAAGGATT CCAATTTTC	Mutagênese Dirigida
pTrcHisF	Forward	(a)	CTCCATATATAATTACATAGC	PCR
3B65TaqI	Reverse	195-214	AACGAGAAGGT CTAGATT CG	PCR
B 1061	Reverse	842-861	CAGCT CAT GGCAGAT GT CAG	PCR e sequenciação
V388M	Reverse	1152-1172	CTCTCT GCCAT GT AATACAGG	PCR
8A299HindIII	Forward	875-896	CCTT GTTTTCAGAT CGCAGCTT	Sequenciação
13B	Forward	1423-1440	GAATAGTT GGDTCCTC	PCR e Sequenciação
12A414RsaI	Reverse	1220-1241	CTCGGCCCTT CTCAGT CGCT	PCR e Sequenciação
5A158MspI	Forward	452-471	ATCCTGT GT ACCGT GCAAGC	Sequenciação
NcoI	Forward	-14 a 5	CCCGGGGA GCCACCAT GGC	Sequenciação

⁽¹⁾ De acordo com Kwok e colaboradores (Kwok SC *et al* 1985) e Konecki e colaboradores (Konecki DS *et al*, 1992);

⁽²⁾ Os nucleótidos mutagênicos encontram-se sublinhados; ⁽³⁾ O primer pTrcHisF hibrida com o vetor pTrcHisB nas posições 370-390.

Tabela 2 – Programas de PCR utilizados na técnica de mutagénese dirigida e para confirmação da sua eficácia.

Programa	Nº Ciclos	Tempo (seg)	Temperatura (°C)
1	1	30	95
	16	30/ 60/ 360	95/ 55/ 68
1 ^a	1	30	95
	16	30/ 60/ 720	95/ 58/ 68
2	1	300/ 60/ 120	92/ 63/ 72
	30	40 / 40 / 90	92/ 63/ 72
	1	300	72
2A	1	300/ 60/ 120	92/ 58/ 72
	30	40 / 40 / 90	92/ 58/ 72
	1	300	72

Após a amplificação, o produto de PCR obtido foi digerido com 10 U da enzima *DpnI* (New Engand BioLabs), durante 1 hora, a 37°C. Findo este tempo procedeu-se à transformação de 50 µL de células de *E.coli* XL1-Blue supercompetentes com uma alíquota de 5 µL do produto anterior. A mistura foi agitada suavemente e colocada a 4°C, durante 30 minutos, tendo depois sido submetida a um choque térmico de 42°C, durante 45 segundos. Posteriormente foi diluída em 500 µL de meio LB líquido (triptona 1%, extracto de levedura 0,5%, NaCl 0,17 M, pH 7) suplementado com glucose a 20 mM, tendo sido incubada durante 1 hora, a 37°C, com agitação moderada. Após centrifugação a 358xg, durante 4 minutos, à temperatura ambiente, eliminou-se 400 µL do sobrenadante. O sedimento celular foi ressuspensso no volume restante, tendo sido utilizado para plaquear uma caixa de meio LB sólido (LB, agar 1,5%) contendo ampicilina, numa concentração de 50 µg/mL (LB/Amp), a qual foi incubada durante a noite (ON) a 37°C.

2.2.2 Preparação dos *constructs* mutagenizados (mini-prep)

Para obtenção dos *constructs* mutagenizados a partir dos transformantes, inoculou-se 5 mL de meio líquido LB/Amp com uma colónia bem isolada de bactérias. Após agitação durante a noite a 37°C, centrifugou-se 1,5 mL da suspensão a 805xg, durante 4 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspensso em 200 µL de STET

(sacarose 8%; Tris-HCl 50 mM, pH 8; EDTA 50 mM; Triton X 0,1%) ao qual se adicionou lisozima (Sigma) numa concentração final de 50 µg/µL. Após 5 min à temperatura ambiente, a mistura foi colocada, durante 5 min, num banho de água fervente. Ao sobrenadante obtido por centrifugação a 12000xg, durante 10 min, à temperatura ambiente, foi adicionada RNase (Sigma) numa concentração final de 25 µg/µL. Após incubação a 68°C, durante 15 min, foram adicionados 85 µL de TNE (Tris-HCl 1 M, pH 8,6; NaCl 3 M; EDTA 200 mM) e água até perfazer um volume de aproximadamente 800 µL. A solução obtida foi extraída com 600 µL de fenol equilibrado com STE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). A 700 µL da fase aquosa, obtida por centrifugação a 12.000xg, durante 10 min, a 4°C, foram adicionados 420 µL de isopropanol. Após incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 12.000xg, durante 10 min, à temperatura ambiente, tendo o precipitado sido lavado com etanol a 70%. Após centrifugação a 12.000xg, durante 3 min, o sedimento foi seco e posteriormente ressuspendido em acetato de sódio 0,3 M, pH 5. O DNA foi novamente precipitado por adição de 750 µL etanol e incubado a -20°C durante 1 hora. Após nova lavagem com etanol a 70%, o DNA obtido foi ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q.

O DNA obtido foi analisado por separação electroforética em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; EDTA 2 mM) e quantificado por leitura da sua absorvência a 280 nm, num espectrofotómetro Hitachi (Modelo U-2000).

2.2.3. Rastreio da eficácia da reacção de mutagénese dirigida

Numa primeira aproximação a eficácia da reacção de mutagénese dirigida foi rastreada no maior número possível de transformantes obtidos. Este rastreio foi efectuado por digestão de fragmentos de DNA resultantes da amplificação por PCR do DNA mutagenizado com enzimas de restrição apropriadas, uma vez que, à excepção da mutação E181K, as alterações introduzidas modificam a sequência de reconhecimento daquelas enzimas. Deste modo, foram amplificados por PCR fragmentos específicos do DNA mutado, utilizando os programas de PCR e os *primers* mais adequados (Tabela 3).

A amplificação do DNA mutado foi realizada num volume reaccional de 50 µL contendo 1 µL de DNA obtido na mini-prep, 50 µM de cada *primer* específico, uma mistura de dNTPs numa concentração final de 200 µM em cada, 2,5 U ou 5 U de Taq DNA polimerase (New England Biolabs) e o tampão fornecido pelo fabricante. Para amplificação do fragmento de DNA contendo a mutação C29S e D151K foi ainda adicionado MgCl₂ de modo a que a concentração final de Mg²⁺ fosse de 3 mM. Em paralelo foram sempre efectuados ensaios controlo, utilizando como molde uma alíquota do DNA pTrcHis-hPAHwt.

Tabela 3 - *Primers, reacções de PCR e enzimas de restrição (ER) utilizados para rastreio da eficácia da reacção de mutagénesis dirigida.*

Mutação	Programa PCR ⁽¹⁾	Primers	Produto PCR (bp)	ER
C29S	2A	pTrcHisF; 3B65Taq	360	<i>Taqα1</i>
C29D	2	pTrcHisF; D145K-R	597	<i>HpyCH4V</i>
C284S	2 ^a	E181K-F; E360K-R	568	<i>Hpy188III</i>
C445S	2A	C445S-F; C445S-R	221	<i>Taqα1</i>
D145K	2	C29D-F; E181K-R	495	<i>DdeI</i>
D151K	2	C29D-F; E181K-R	495	<i>MboI</i>
E360K	2	E181K-F; V388M	643	<i>Hpy188I</i>

⁽¹⁾ De acordo com o descrito na Tabela 2.

Após a confirmação da presença do fragmento de DNA com o tamanho esperado, por visualização em gel de agarose a 2%, procedeu-se à sua digestão com as enzimas de restrição apropriadas (Tabela 3). Assim, a uma alíquota de 5 µL do DNA amplificado adicionou-se a enzima de restrição específica (1 U por µg de DNA) e o respectivo tampão de digestão, num volume final de 20 µL. A digestão decorreu durante a noite, à temperatura específica recomendada para cada enzima de restrição. De modo a confirmar a hidrólise pelas enzimas de restrição, as amostras foram posteriormente sujeitas a uma electroforese em gel de agarose, a 2%, em tampão TBE.

Após confirmação da introdução da mutação desejada, foi então preparada uma quantidade elevada do DNA mutado com o auxílio do sistema Qiagen Plasmid Midi (Qiagen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (midi-prep).

2.2.4. Sequenciação do cDNA mutagenizado

O cDNA mutagenizado foi sequenciado de modo a ser confirmada a introdução das mutações pretendidas e a ausência de alterações adicionais. A reacção de sequenciação foi realizada na STAB VIDA[®] utilizando os *primers* de sequenciação descritos na Tabela 1, numa concentração de 10 pmol/ μ L e os DNAs obtidos na midi-prep, numa concentração de 50 ng/ μ L.

2.3. Indução da expressão proteica

Para se proceder à expressão das proteínas PAH recombinantes, transformou-se uma alíquota de 100 μ L de células de *E.coli* TOP10 competentes com 10 ng de DNA (numa concentração de 1 ng/ μ L). Após agitação suave procedeu-se à incubação desta mistura a 4°C, durante 30 minutos. Posteriormente as células foram incubadas durante 90 segundos, a 42°C (choque térmico). Findo este tempo adicionou-se 1 mL de meio LB líquido suplementado com 20 mM de glucose. Após 1 hora de incubação a 37°C, com agitação suave, a suspensão celular foi centrifugada a 300xg, durante 4 minutos, à temperatura ambiente, tendo sido desprezado 1 mL do sobrenadante obtido. O sedimento celular foi ressuspensso no volume restante (\approx 100 μ L), tendo sido utilizado para semear caixas de Petri com meio sólido LB/Amp, as quais foram incubadas durante a noite, a 37°C.

Das placas contendo os transformantes foi seleccionada uma colónia bem isolada para inocular meio líquido LB/Amp (5 ou 10 mL). Após incubação a 37°C durante a noite, com agitação permanente, a suspensão celular obtida foi diluída a 1/100 em meio líquido LB/Amp tendo-se procedido a uma nova incubação, a 37°C, com agitação constante, até que as células atingissem a fase exponencial de crescimento ($Abs_{600nm} \geq 0,6$). A sobreexpressão das proteínas PAH em estudo foi então induzida através da adição de 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactosidase (IPTG; Eurobio). Simultaneamente foi adicionado 0,1 mM de sulfato de amónio ferroso (Fe^{2+}). Após incubação durante 3 horas, a 37°C, com agitação constante, foi obtido o sedimento celular por centrifugação a 6000xg, durante 10 minutos, a 4°C. Este sedimento

bacteriano foi armazenado a -20°C , por períodos nunca superiores a 1 mês, até posterior utilização.

Para co-expressão das proteínas hPAH e GroESL foi seleccionada uma colónia de células co-transformadas a qual foi utilizada para inocular 5 ml de meio LB contendo Amp e Cm. Após incubação durante a noite, a 30°C , a suspensão bacteriana foi diluída 100x e incubada a 30°C até que $\text{Abs}_{600\text{nm}} \geq 0,6$. A expressão simultânea das proteínas hPAH e groESL foi então induzida pela adição de anidro-tetraciclina (100 mg/ml) e pelo aumento da temperatura da cultura para 37°C .

2.4. Purificação das proteínas PAH recombinantes

Para purificação das proteínas expressas, o sedimento celular foi ressuspensionado em tampão de lise (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,8; glicerol 10%) contendo 1 mM de fenilmetanosulfonyl fluoreto (PMSF) (Sigma) e 1 mg/mL de lisozima (Eurobio) na proporção de 1 L cultura/10 mL de tampão de lise. Após incubação, durante 30 minutos, a 4°C , as células foram lisadas num sonicador Vibra Cell (Sonics Materials), através da aplicação de 3 ciclos (*duty free cycle* de 50%) de 60 segundos. Entre cada ciclo o lisado celular foi mantido a 4°C , durante 20 segundos, para permitir o arrefecimento da amostra. A suspensão obtida foi centrifugada a $10.000\times g$, durante 20 minutos, a 4°C , para separar os resíduos membranares da fracção citoplasmática solúvel. Ao sobrenadante obtido (fracção solúvel) foi adicionado imidazol e β -mercaptoetanol numa concentração final de 10 mM.

Como referido anteriormente, as proteínas expressas foram purificadas por IMAC. Neste trabalho usou-se a resina Ni-NTA (Qiagen) na proporção de 10 mL de lisado/500 μL de resina. Antes da sua utilização a resina foi preparada através de três lavagens sucessivas com 1 volume de água Milli-Q e 2 lavagens com o mesmo volume de tampão de lise, contendo 10 mM de imidazol. Entre cada lavagem a resina foi centrifugada a $360\times g$, durante 2 minutos, rejeitando-se o sobrenadante.

A fracção proteica solúvel obtida foi então colocada em contacto com a resina durante 1 hora, a 4°C , com agitação constante. A suspensão foi posteriormente introduzida em colunas cónicas de polipropileno (0,8 x 4 cm), com 9 cm de altura (poly-prep; Biorad) e a solução de passagem (*flow-through*) recolhida. A purificação das

proteínas foi efectuada a 4°C, procedendo-se num primeiro passo à lavagem da coluna com 4 volumes de tampão de lise contendo 20mM de Imidazol e 10% de Glicerol. As proteínas foram eluídas pela passagem de tampão de lise contendo 150 mM de Imidazol e 10% Glicerol (duas fracções de 1 mL).

Os eluídos recolhidos foram dialisados durante a noite, a 4°C, em tampão de diálise (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 0,1 M; KCl 100 mM), utilizando uma membrana com um *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO) de 12-14.000 Da (Spectra/Por®4). Até posterior utilização as proteínas puras foram armazenadas, em alíquotas, em azoto líquido. Uma vez descongelada, a proteína não voltou a ser congelada.

2.5. Isolamento das formas oligoméricas das proteínas recombinantes

A separação das formas oligoméricas da proteína PAH foi efectuada por cromatografia preparativa de exclusão molecular, utilizando uma coluna HiLoad™ 16/60 (GE Healthcare), num sistema AKTA Prime™ Plus da GE-Healthcare, com um fluxo constante de 1 mL/min, com detecção por UV e um colector de fracções acoplado. A fase móvel, constituída por Na-Hepes 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 6,5, foi previamente filtrada, utilizando uma membrana de 0,45 µm e desgaseificada durante 15 minutos, num banho de ultra-sons. Como marcador de massas moleculares (MW) foi utilizado o *Gel filtration standard* (BioRad) composto por tiroglobulina (670 kDa), gamaglobulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B₁₂ (1,35 kDa) e uma mistura de proteínas, adquiridas à Sigma, de grau de pureza adequado para cromatografia de filtração em gel constituída por apoferritina (443 kDa), desidrogenase alcoólica (150 kDa) e albumina (66 kDa) numa concentração de 5 mg/mL em cada.

3. ENSAIOS DE ESTABILIZAÇÃO *IN VIVO* DE FORMAS hPAH PATOGENICAS

3.1. Chaperones químicos estudados *in vivo*

Como agentes estabilizadores de proteínas hPAH mutantes recém-sintetizadas foram estudados o glicerol, o óxido de trimetilamina (TMAO), o 4-fenilbutirato (4-PBA) e a taurina. As soluções de trabalho foram preparadas em água Milli-Q estéril a partir de soluções *stock*, tendo sido posteriormente esterilizadas por filtração em membranas de 0,2 µm (Pall) e armazenadas à temperatura ambiente. Deste modo, foram testadas concentrações de glicerol de 0,5; 1; 5 e 10% (v/v) as quais foram preparadas a partir de uma solução de glicerol a 100% (Merck; grau analítico). O TMAO (Sigma; grau analítico) foi utilizado nas concentrações de 5, 10 e 50 mM, efectuadas a partir de uma solução 4 M. O 4-fenilbutirato de sódio (Merck; grau analítico) foi preparado numa concentração prévia de 1 M (com adição de NaOH 2.5 M até completa dissolução) a partir da qual se obteve soluções de 1; 2,5 e 5 mM. A taurina (Sigma; grau analítico) foi testada nas concentrações de 2,5; 5 e 10 mM preparadas a partir de uma solução de 0,5 M.

3.2. Expressão das proteínas recombinantes

Para estudar o efeito estabilizador dos chaperones químicos sobre as proteínas hPAH mutantes, estes foram adicionados, nas concentrações referidas no parágrafo anterior, no momento da indução, simultaneamente com o IPTG e o sulfato de amónio ferroso (ver parágrafo 2.3.).

4. ENSAIOS DE ESTABILIDADE *IN VITRO* DA FORMA SELVAGEM

4.1. Estabilizantes utilizados

Os aditivos utilizados nos ensaios de estabilidade foram o glicerol, o manitol, o polietilenoglicol 6000 (PEG-6000), a sacarose e a trealose. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico, tendo o glicerol, a sacarose e a glucose sido

adquiridos à Merck e os restantes reagentes à Sigma. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de soluções concentradas de glicerol a 100% (m/v), manitol a 20% (m/v), PEG-6000 a 100%, glucose a 30 % (m/v), sacarose a 30% (m/v) e trealose a 30% (m/v). Antes da sua utilização as soluções testadas foram esterilizadas por filtração em membranas de 0,2 μm (Pall).

4.2. Ensaio em solução

Para efectuar os estudos de estabilidade de soluções da proteína hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, após purificação da proteína recombinante esta foi dividida em alíquotas as quais foram armazenadas na ausência e na presença de diferentes aditivos (Tabela 4), a diferentes temperaturas (Tabela 4), por um período máximo de um mês. Os ensaios para determinação das propriedades da hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento foram efectuados nas alíquotas correspondentes as quais não voltaram a ser utilizadas.

Tabela 4 – Condições de armazenamento testadas nos ensaios de estabilidade em solução: agentes estabilizantes, tempo e temperatura de armazenamento.

Agente estabilizante (m/v)	Temperatura de armazenamento ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de armazenamento (dias)
Tampão de diálise	4 e -20	0, 1, 2, 8, 15 e 30
Glicerol 50%	4 e -20	0, 1, 2, 8, 15 e 30
Manitol 10%	4 e -20	0, 1, 2, 8, 15 e 30
PEG-6000 30%	4 e -20	0, 1, 2, 8, 15 e 30
Sacarose 5%	4 e -20	0, 15, 30
Trealose 5%	4 e -20	0, 15, 30

4.3. Ensaio de liofilização

Nos ensaios de liofilização foram utilizados como aditivos o glicerol a 50% (m/v), o manitol a 10% (m/v) e a sacarose, trealose e glucose a 5% (m/v). As soluções proteicas obtidas foram divididas em alíquotas e armazenadas a -180°C (azoto líquido). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas num aparelho Christ Alpha 1-4 (B Braun Biotech International) ON, tendo sido transportadas até ao liofilizador em azoto líquido.

O liofilizado proteico foi armazenado a 4°C, na presença de um agente exsicante (sílica-gel).

5. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PRODUZIDAS

5.1. Quantificação proteica

Para quantificação das proteínas recombinantes recorreu-se ao método colorimétrico de Bradford (Bradford MM, 1976) utilizando o reagente *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad). A curva de calibração foi construída utilizando albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 1, 2, 4, 8 e 10 µg/mL. Para quantificação das soluções proteicas com aditivos as curvas de calibração de BSA foram preparadas na presença do respectivo aditivo na concentração em estudo (ver parágrafos 4.2. e 4.3.). As leituras de absorvência foram efectuadas a 595 nm num espectrofotómetro Hitachi (modelo U-2000), tendo os ensaios sido efectuados em triplicado.

5.2. Avaliação do grau de pureza

A determinação do grau de pureza, bem como a massa molecular das proteínas recombinantes produzidas, foi avaliada por electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS/PAGE) segundo a técnica de Laemmli (Laemmli UK, 1970).

A separação das amostras foi realizada num sistema de electroforese mini-vertical Hoefer SE245 (GE Healthcare) utilizando géis com as dimensões de 80x60x1 mm e um sistema descontínuo de tampões Tris-Glicina, o mais adequado para separação de proteínas com massas moleculares superiores a 20 kDa. Este sistema é constituído por três tampões diferentes, nomeadamente um tampão de concentração (Tris-HCl 0,125 mM, pH 6,8; SDS 0,1%), um tampão de separação (Tris-HCl 0,375 mM, pH 8,8; SDS 0,1 %) e um tampão de electroforese (Tris base 3 g/L; glicina 14,4 g/L; SDS 1 g/L; pH 8,3). Os géis de separação e concentração foram preparados nas concentrações de acrilamida/bisacrilamida (30% T e 2,67% C) de 10% e 4% respectivamente.

As amostras em estudo foram aplicadas num volume final de 20 μ l, tendo sido diluídas em tampão de deposição 5 vezes concentrado constituído por Tris-HCl 0,24 M pH 6,8; glicerol 40%; SDS 8%; azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 25% (adicionado apenas antes da desnaturação). Antes da aplicação as amostras foram desnaturadas durante 5 minutos, num banho de água fervente.

A separação electroforética foi efectuada através da aplicação de uma corrente contínua de 20 mA durante a entrada das amostras no gel de concentração, tendo a intensidade de corrente sido aumentada para 40 mA, quando as amostras entraram no gel de separação. Durante a corrida o sistema foi arrefecido com um caudal contínuo de água fria.

As proteínas separadas no gel foram visualizadas por coloração com azul brilhante de Comassie R250 (Azul Comassie R-250 0,1 %; metanol 27%; ácido acético 18%) e diferenciadas com uma solução contendo 30% metanol e 10% ácido acético. A massa molecular aproximada das proteínas em estudo foi determinada por comparação com o perfil electroforético do marcador de massas moleculares *Pre-Stained Low Range* (BioRad), constituído por fosforilase B (103 kDa); albumina de soro bovino (77 kDa); ovalbumina (50 kDa); anidrase carbónica (34,3 kDa); inibidor de tripsina de soja (28,8 kDa) e lisozima (20,7 kDa). Sempre que foi necessário determinar a massa molecular das proteínas analisadas foi utilizado o marcador de massas moleculares *SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range* (BioRad), o qual é composto por: fosforilase B (97,4 kDa); albumina de soro bovino (66,2 kDa); ovalbumina (45 kDa); anidrase carbónica (31 kDa); inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

5.3. Determinação do ponto isoeléctrico

O ponto isoeléctrico (pI) das proteínas produzidas foi determinado através da utilização da técnica de electroforese bidimensional. Nesta técnica as proteínas são separadas, numa primeira fase (primeira dimensão), de acordo com o seu ponto isoeléctrico (focagem isoeléctrica) e numa segunda fase de acordo com a sua massa molecular (segunda dimensão).

A focagem isoeléctrica foi realizada num sistema PROTEAN IEF Cell (BioRad) utilizando o método de rehidratação activa. Neste método as amostras proteicas são transferidas para as bandas de gel onde posteriormente ocorre a separação de acordo

com o seu ponto isoelectrico. A separação foi efectuada em bandas de gel (IPG *strips*) de 7 cm, com um gradiente de pH de 5-8 adquiridas à Bio-Rad (*ReadyStrip IPG strips*, 7 cm, pH 5-8). Como padrão foi utilizado o 2-SDS-PAGE *standard* (Bio-Rad) o qual é constituído por conalbumina da clara de ovo de galinha (MW 76 kDa; pI 6,0/ 6,3/ 6,6); BSA (MW 66,2 kDa; pI 5,4/ 5,5/ 5,6); actina de músculo bovino (MW 43 kDa; pI 5,0/ 5,1); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (MW 36 kDa; pI 8,3/ 8,5); anidrase carbónica bovina (MW 31 kDa; pI 5,9/ 6,0); inibidor de tripsina de soja (MW 21,5 kDa; pI 4,5) e mioglobina equídea (MW 17,5 kDa; pI 7,0).

Deste modo, uma fracção da amostra de proteína ($\approx 2 \mu\text{g}$) foi diluída em tampão de rehidratação (ureia 8 M, CHAPS 2%, ditiotretol (DTT) 50 mM, 0,2% (p/v) de anfólitos Bio-Lyte[®] 3/10 (Bio-Rad), um pouco de azul de bromofenol) num volume final de 125 μL . Para separação da solução controlo foram adicionados 20 μL de marcador de massas moleculares a 105 μL de tampão de rehidratação. As amostras assim preparadas foram espalhadas ao longo de um suporte (corredor) de 7 cm. As IPG *strips* foram então colocadas por cima da amostra, tendo o cuidado de evitar a formação de bolhas entre a amostra e a banda. A rehidratação activa decorreu a 20 V, durante 12 horas, a 20°C, tendo este passo sido suspenso uma hora após o início para a colocação de óleo mineral sobre as bandas, continuando depois a rehidratação por mais 11 horas.

Após o passo de rehidratação, procedeu-se então à separação proteica por focagem isoelectrica. No entanto, antes de dar início a este processo foram colocados sobre os electrodos, quadrados de papel de filtro molhados em 50 μL de água desionizada, de modo a absorver o excesso de sais presentes no tampão e que poderão interferir com a migração das proteínas. A focagem isoelectrica processou-se de acordo com o aconselhado pelo fabricante, utilizando o programa descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições utilizadas na focagem isoelectrica

	Voltagem (V)	Tempo	V.h	Rampa
Passo 1	250	20 min		Linear
Passo 2	4000	2 h		Linear
Passo 3	4000		10.000	Rápida
Total		$\approx 5 \text{ h}$	≈ 14.000	

Após a focagem isoelectrica procedeu-se à preparação das amostras para a separação em gel SDS-PAGE (2ª dimensão). Deste modo, as IPG *strips* foram retiradas

do tabuleiro onde se processou a focagem isolétrica, tendo o excesso de óleo mineral sido absorvido com um papel de filtro humedecido com água desionizada. Posteriormente foram mergulhadas rapidamente em tampão de electroforese (parágrafo 5.2.) e colocadas em seguida, durante 20 minutos, numa solução contendo ureia 6 M, glicerol a 20%, SDS a 2% e DTT a 2%. Findo este tempo as IPG *strips* foram novamente lavadas com tampão de electroforese, incubadas por mais 20 minutos numa solução contendo ureia 6 M, glicerol a 20%, SDS a 2% e iodoacetamida a 2,5% e lavadas uma última vez em tampão de electroforese.

Após a preparação das IPG *strips*, estas foram colocadas no sistema de SDS-PAGE descrito no parágrafo 5.2.. Sobre as amostras foi adicionada agarose de baixo ponto de fusão, a 0,5% com um pouco de azul de bromofenol. Os géis foram mantidos à temperatura ambiente, durante 10 minutos e posteriormente foram colocados a 4°C, durante 20 minutos. Findo este tempo procedeu-se então à separação electroforética de acordo com o descrito no parágrafo 5.2.

Uma vez dada como finda a separação electroforética, as proteínas foram visualizadas após coloração dos géis com uma suspensão coloidal de azul de Comassie G-250 (azul de Comassie G-250 0,1%, sulfato de amónia 17%, ácido orto-fosfórico 3%, metanol 34%) e diferenciação com água desionizada.

5.4. Determinação da composição oligomérica das proteínas recombinantes

A determinação da composição oligomérica das proteínas recombinantes foi efectuada num sistema de cromatografia líquida de alta resolução de exclusão molecular (HPLC-SEC). Assim, foi utilizado um sistema de HPLC da Shimadzu equipado com uma bomba modelo LC-6A, um detector de fluorescência modelo RF-551 (com comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) ajustados para 280 e 330 nm, respectivamente) e um registador-integrador modelo C-R6A com velocidade de papel a 5 mm/min. As injecções foram efectuadas num injector Rheodyne, modelo 7125, equipado com um loop de 20 μ L. A separação cromatográfica foi efectuada numa coluna Bio-Sil® SEC 250-5 (Bio-Rad), de 300 mm x 7,8 mm, adequada para separação de proteínas com massas moleculares entre 10.000-300.000 kDa. A fase móvel, constituída por Na-Hepes 20 mM, pH 7; NaCl 0,15 M, foi bombeada a um fluxo

constante de 0,5 mL/min, tendo sido previamente filtrada por membrana de 0,45 µm (Pall) e desgaseificada durante 15 minutos, num banho de ultra-sons.

Como solução controlo foi utilizado o marcador de massas moleculares *Gel filtration standard* descrito no parágrafo 2.5.

5.5. Análise das proteínas recombinantes por Western Blotting

Para execução da técnica de Western-Blotting, após separação electroforética (parágrafo 5.2.) as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Supported nitrocellulose* de 0.45 µm, da Bio-Rad) num sistema semi-seco (Trans-Blot SD; Bio-Rad). A transferência foi efectuada na presença do tampão Towbin (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol pH 8,3) (Towbin H *et al*, 1979), durante 90 minutos, tendo sido aplicada uma corrente de 100 mA com uma voltagem nunca superior a 25V de acordo com o recomendado pelo fabricante.

As proteínas imobilizadas foram visualizadas por imunodeteccção utilizando para as proteínas 6xHis-hPAH o anticorpo primário anti-XpressTM (Invitrogen) e para as proteínas GroESL o anticorpo primário monoclonal Mouse anti-GroEL (Stressgen). Como anticorpo secundário foi utilizado o anti-mouse igG (H+L) conjugado com a enzima *horseradish* peroxidase (HRP), proveniente da Promega. A presença da HRP permite a visualização das proteínas marcadas através da utilização de um sistema contendo luminol, que ao ligar-se ao anticorpo secundário emite luz, sendo esta detectada numa película fotográfica.

Assim, após efectuada a transferência, lavou-se a membrana por três vezes com tampão PBS/T (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,05% Tween 20), durante 5 minutos cada. De modo a evitar hibridações inespecíficas a membrana foi incubada com tampão de bloqueamento (5% leite magro em PBS/T), durante 1 hora. Findo este tempo, efectuaram-se 3 lavagens, de 5 minutos cada, com PBS/T, tendo-se então procedido à incubação, durante a noite, a 4°C, da membrana com o anticorpo primário, o qual foi diluído (1:5000) em tampão de bloqueamento. Posteriormente a membrana foi lavada por 3 vezes, durante 5 minutos com PBS/T e incubada durante uma hora, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário, o qual tinha sido previamente diluído (1:20.000) em tampão de bloqueamento. Após a incubação com o anticorpo secundário a membrana foi novamente lavada por 3 vezes,

durante 5 minutos com PBS/T. Para proceder à visualização das proteínas marcadas utilizou-se o sistema SuperSignal® West Pico Trial (Pierce). Assim, a membrana foi mergulhada durante 2 minutos, na ausência de luz, numa solução contendo 400 µL de solução de peróxido, 400 µL da solução de luminol e 9,8 mL de água.

Após este tempo, a membrana foi imediatamente colocada em contacto com um filme de quimioluminescência (Hyperfilm™; ECL; GE Healthcare) ao sinal emitido pela membrana. Após 30 minutos de exposição a película foi revelada, utilizando como solução reveladora a Polymax RT Developer/Replenisher (Processing chemicals, KODAK) (Sigma) e solução fixadora a Polymax RT Fixer/Replenisher (Processing chemicals, KODAK) (Sigma).

5.6. Caracterização enzimática

5.6.1. Determinação da actividade enzimática

Após obtenção das proteínas recombinantes purificadas, as suas actividades enzimáticas específicas foram determinadas pela avaliação da tirosina formada (ng Tyr.min⁻¹.mg⁻¹). Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicado, a uma temperatura constante de 25°C, na presença de oxigénio atmosférico (Martinez A *et al*, 1995). Assim, num volume final de 250 µL procedeu-se, numa primeira fase à incubação, durante 4 minutos de 15 µg de 6xHis hPAH (em tampão Na-HEPES 100mM pH 7) com 1600 U/mL de catalase (Boehringer) e 1 mM de L-Phe. Após a pré-activação pelo substrato foi adicionado sulfato de amónio ferroso (100 µM), tendo a mistura reaccional sido incubada por mais 2 minutos. Findo este tempo deu-se início à reacção enzimática pela adição de 500 µM do cofactor sintético 6-MPH₄ ou da adição de 75 µM do cofactor natural BH₄ (Sigma). Ao fim de 1 minuto a reacção foi parada pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%.

Após centrifugação a 10000 xg, durante 5 minutos a tirosina formada foi quantificada indirectamente pelo método do nitrosoaftol (Kaufman S, 1987). Este composto promove a formação de um derivado de tirosina fluorescente. Assim, a 700 µL de sobrenadante foram adicionados 350 µL de uma solução de nitrosoaftol (1-nitroso-2-naftol 0,1% em etanol a 95%) e 350 µL de NaNO₂ (NaNO₂ 0,5 mg/mL; HNO₃

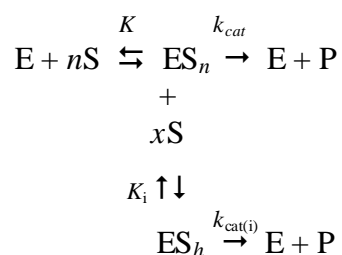
20%) extemporâneo. Após 30 minutos de incubação a 55°C, a mistura reaccional foi colocada em gelo, durante 5 minutos, tendo o derivado formado sido posteriormente extraído com 3,5 mL de 1-2-dicloroetano. A fase aquosa obtida por centrifugação a 1500 rpm (rotor basculante, centrífuga Alresa) durante 5 minutos, foi utilizada para a determinação da Tyr produzida através de detecção colorimétrica, num espectrofotómetro Hitachi, modelo U-2000 (λ 450nm) e/ou fluorimétrica, num espectrofluorímetro Hitachi, modelo F-2000 (λ_{exc} 460 nm e λ_{em} 570 nm).

Em paralelo foram construída duas curvas de calibração para diferentes intervalos de concentração de Tyr, nomeadamente uma gama baixa (0,5-5 μ M) e uma gama alta (5-25 μ M). A actividade específica das várias formas da enzima 6xHis-hPAH foram calculadas em nmol de Tyr formada por mg de proteína e por minuto (nmol Tyr.mg⁻¹.min⁻¹).

5.6.2. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, procedeu-se de acordo com o descrito no ponto anterior, tendo-se variado a concentração de substrato L-Phe no meio reaccional de 100 a 25000 μ M. Estes ensaios foram sempre efectuados na presença do cofactor natural BH₄ numa concentração de 75 μ M e sem pré-activação pelo substrato L-Phe. Assim, foi eliminado o passo de incubação prévia com L-Phe, sendo este aminoácido adicionado ao meio reaccional após adição do cofactor natural.

Os parâmetros cinéticos foram determinados tendo em conta que a PAH apresenta não só cooperatividade para a ligação ao substrato mas também inibição pelo substrato:



Assim, foi utilizada a equação de Hill modificada, de LiCata e Allewell (LiCata VJ *et al*, 1997):

$$v = \frac{V_{\max} + V_i ([S]^x / K_i^x)}{1 + (K^h / [S]^h) + ([S]^x / K_i^x)} \quad (\text{equação 1})$$

Onde V_{\max} e V_i correspondem às constantes catalíticas k_{cat} e $k_{\text{cat}(i)}$, respectivamente, h é o coeficiente de Hill e x é um segundo coeficiente de Hill que tem em conta que a inibição pelo substrato também possa ser cooperativa. À semelhança da enzima aspartato transcarbamilase o valor de x mais adequado para a fenilalanina hidroxilase foi de 2 (LiCata VJ *et al*, 1997).

5.7. Avaliação da conformação das proteínas recombinantes

5.7.1. Proteólise limitada

Para determinar a resistência das proteínas recombinantes à proteólise, estas foram diluídas em tampão Na-Hepes 20 mM, pH 7, numa concentração de 0,5 µg/mL. À solução proteica foi adicionada tripsina (Sigma), numa proporção de 1:200 (m:m). A reacção enzimática processou-se durante uma hora, a 25°C, tendo sido retiradas alíquotas de 5 em 5 minutos, às quais se adicionou um inibidor da tripsina (*soybean trypsin inhibitor*; Sigma) numa proporção de 1:1 (m:m). Os fragmentos proteicos obtidos foram analisados por SDS-PAGE (parágrafo 5.2.).

5.7.2. Espectros de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para monitorizar a ocorrência de desnaturação das proteínas recombinantes em estudo. Deste modo, os espectros de fluorescência intrínseca das diferentes formas de hPAH foram determinados num espectrofluorímetro da Hitachi (modelo F-2000), utilizando um λ_{exc} de 295 nm (fenda de 6 nm) e um λ_{em} entre 300 e 460 nm (fenda de 4 nm), uma velocidade de varrimento

de 240 nm.s⁻¹ e uma concentração proteica de 40 µg/mL (Kleppe R *et al*, 1999). Os espectros das amostras foram sempre corrigidos com o espectro de emissão obtido para a solução tampão.

Foi ainda utilizado uma amostra de proteína hPAH como controlo de desnaturação. Assim, promoveu-se a desnaturação proteica pela incubação (± 30 min), a 25°C, no escuro com cloreto de guanidina 6 M.

5.7.3. Ensaio de quenching

Os ensaios de *quenching* permitem determinar a acessibilidade dos resíduos de triptofano na proteína em estudo, sendo assim possível monitorizar eventuais alterações no *folding* das amostras de hPAH. Como *quenchers* foram utilizados a acrilamida (Roche; grau de pureza para electroforese) e o KI (Merck, grau de pureza para análise), de acordo com a técnica descrita por Coutinho A e Prieto M (Coutinho A e Prieto M, 2003). Assim, a 1 mL de proteína PAH recombinante (40 µg/mL de enzima em tampão Na-Hepes 0,1 M, pH 7; NaCl 0,2 M) adicionou-se sucessivamente 10 µL de solução de *quencher* (acrilamida 5 M em tampão Na-Hepes 0,1 M; NaCl 0,2 M ou KI 5 M contendo Na₂S₂O₃ 10 mM) (Knappskog PM e Haavik J, 1995). Após cada adição de *quencher* procedeu-se à leitura da intensidade de fluorescência (λ_{exc} de 295 nm e λ_{em} de 315, 340 e 350 nm) num espectrofluorímetro Hitachi (modelo F-2000). Foram também medidas as intensidades de fluorescência da solução de tampão Na-Hepes 0,1 M; NaCl 0,2 M (branco) e da solução branco contendo 100 µL de *quencher* (volume máximo utilizado), e as absorvências a 295 nm, da amostra sem *quencher* e com o máximo de volume de *quencher*. Os valores de intensidade de fluorescência foram corrigidos para a diluição efectuada ao longo da adição de *quencher*. Foi também efectuada a correcção para a absorvância do *quencher* a 295 nm.

Os dados obtidos foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer (equação 2) e a equação de Stern-Volmer modificada (equação 3), aplicada a sistemas heterógeneos (Lehrer SS, 1971):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{equação 2})$$

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{[Q]f_a K_{SV}} + \frac{1}{f_a} \quad (\text{equação 3})$$

Onde $[Q]$ representa a concentração de *quencher*; F_0 representa a intensidade de fluorescência na ausência de *quencher*; F é o valor da intensidade de fluorescência para a concentração de *quencher* $[Q]$; f_a fração acessível ao *quencher* e K_{SV} representa a constante de Stern-Volmer (constante de *quenching*).

5.7.4. Espectros de dicroísmo circular em UV longínquo

O espectro de dicroísmo circular (CD), no UV longínquo, das proteínas recombinantes em estudo foi obtido num Espectropolarímetro Jasco (modelo M-715), com uma resolução de 0,2 nm. A temperatura do suporte da célula foi controlada por um sistema de Peltier.

Para efectuar estes ensaios as proteínas foram diluídas em tampão apropriado (Na-Hepes 0,02 M; NaCl 0,15 M; pH 7,0), numa concentração de 0,1 mg/mL ($\approx 2 \mu\text{M}$), num volume total de 200 μL .

As rampas de desnaturação térmica foram realizadas nas mesmas condições, com uma variação constante de temperatura dos 25°C aos 80°C.

5.8. Ensaios de estabilidade proteica

5.8.1. Equilíbrio de desnaturação

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) das proteínas recombinantes foi determinada por ensaios de desnaturação com a ureia. As proteínas, numa concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ (em tampão Na-Hepes 0,1 M, pH 7,5; NaCl 200 mM; EDTA 1,25 mM), foram incubadas a 25°C, no escuro, durante 18 horas, na presença de concentrações de ureia (Promega, grau de pureza para Biologia Molecular) que variaram entre 0 e 7,5 M. As leituras de fluorescência foram realizadas utilizando um λ_{exc} de 295 nm e aos λ_{em} de 337, 345 e 355 nm (Kleppe R *et al*, 1999).

As curvas de desnaturação foram analisadas de acordo com o modelo de três estados. Assim, para as transições $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons F$ (sendo N o estado nativo, I o estado intermediário e F o estado desnaturado) pode ser assumido que cada passo segue um mecanismo de dois estados. A fracção do estado intermediário f_I , no passo $N \rightleftharpoons I$ pode ser determinada a partir de:

$$f_I = \frac{b_n^0 + a_n[C] - y}{b_n^0 + a_n[C] - b_i^0 - a_i[C]} \quad (\text{equação 4})$$

A fracção desnaturada do passo $I \rightleftharpoons D$ é representada por:

$$f_D = \frac{b_i^0 + a_i[C] - y}{b_i^0 + a_i[C] - b_d^0 - a_d[C]} \quad (\text{equação 5})$$

Onde y representa a intensidade de fluorescência para um valor de concentração de desnaturante $[C]$; b_n^0 , b_i^0 e b_d^0 são os valores da intensidade de fluorescência para o estado nativo, intermediário e desnaturado para uma concentração de desnaturante de 0M, respectivamente; e a_n , a_i e a_d são os declives das linhas de base do estado de pré-transição e pós-transição, respectivamente.

A variação da energia livre de Gibbs após desnaturação, ΔG_{NI} e ΔG_{ID} , foi calculada utilizando o modelo da extrapolação linear proposto por Green e Pace (Green e Pace, 1974) assumindo o modelo de dois estados de transição para cada passo de acordo com:

6

$$\Delta G_{NI} = -RT \ln K_{NI} = -RT \ln(f_I/(1-f_I)) \quad (\text{equação 5})$$

$$7\Delta G_{ID} = -RT \ln K_{ID} = -RT \ln(f_D/(1-f_D)) \quad (\text{equação 6})$$

$$\Delta G_{NI} = \Delta G_{NI}^0 - m_{NI}[C] \quad (\text{equação 8})$$

$$\Delta G_{ID} = \Delta G_{ID}^0 - m_{ID}[C] \quad (\text{equação 9})$$

Onde para cada passo, K_{NI} e K_{ID} são as constantes de equilíbrio; ΔG_{NI}^0 e ΔG_{ID}^0 representa a variação de energia livre de Gibbs após desnaturação na ausência de agente desnaturante (em água) e m_{NI} e m_{ID} são os declives da correlação linear entre ΔG_{NI} ou ΔG_{ID} e $[C]$, respectivamente.

5.8.2. Perfil de inactivação

Para determinação do perfil de inactivação da proteína PAH esta foi incubada a 37°C, por um período máximo de 2 horas, tendo sido retiradas alíquotas aos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos. Nestas amostras foi determinada a actividade enzimática residual, como descrito no ponto 5.6.1.

5.8.3. Perfil de estabilidade térmica

A estabilidade térmica das proteínas PAH em estudo foi efectuada por incubação durante 10 minutos, às temperaturas de 30, 37, 42, 45, 50 e 60°C. Findo este tempo as amostras foram colocadas imediatamente no gelo, tendo a actividade enzimática sido determinada como descrito no ponto 5.6.1.

5.9. Análise dos resultados

A estimativa do grau de pureza e do grau de digestão com tripsina foi efectuada por análise semi-quantitativa das proteínas recombinantes após separação electroforética. As imagens foram digitizadas com o Scanner HP scanjet 4070 photosmart (Hewlett-Packard) as quais foram posteriormente analisadas com o programa *Gel-Pro analyser*, versão 4.5 (MediaCybernetics). Os dados experimentais nos ensaios de desnaturação com a ureia, nos estudos de quenching e de cinética enzimática foram ajustados com o programa SigmaPlot versão 8.02 (SPSS Inc.) e submetidos a análise de regressão.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo I
Estabilização da
Fenilalanina Hidroxilase Humana

1. INTRODUÇÃO

A terapêutica convencional para a PKU consiste numa restrição dietética, a qual deverá ser mantida durante toda vida. Assim, estes doentes devem evitar a ingestão de alimentos ricos em L-Phe. Uma vez que este aminoácido se encontra presente na maioria dos alimentos, a dieta instaurada é, de um modo geral, muito restritiva, tornando difícil a adesão por parte do doente. Por outro lado, poderá também conduzir ao aparecimento de carências nutritivas graves.

Estes factos têm levado à pesquisa de alternativas ao tratamento dietético. A terapia enzimática de reposição tem sido uma abordagem pouco explorada uma vez que a hPAH tem sido considerada uma proteína instável e portanto de difícil utilização como agente terapêutico (Gámez A *et al*, 2004).

1.1. As proteínas como agentes terapêuticos

As proteínas são macromoléculas que do ponto de vista físico-químico apresentam uma elevada instabilidade o que limita a sua utilização como agentes terapêuticos. A sua funcionalidade depende da manutenção de uma estrutura tridimensional complexa, a qual deverá ser preservada, não só durante o processo de formulação e armazenamento, mas também durante a passagem pelas diferentes barreiras biológicas de modo a exercer a sua actividade no órgão alvo.

A integridade e a funcionalidade da proteína terapêutica no órgão alvo poderão depender da via de administração. As proteínas administradas por via gastro-intestinal poderão estar sujeitas a uma rápida degradação enzimática, por acção das peptidases e proteases existentes no sistema digestivo humano, ou a uma degradação química (devido ao baixo pH do estômago). Devido à presença de peptidases e proteases na mucosa nasal, a administração por via nasal poderá também conduzir à degradação proteica. Deste modo, a administração parentérica é a mais comum, já que a ausência de sistemas de degradação enzimática e/ou química não irá comprometer a conformação funcional da proteína permitindo que esta atinja o órgão alvo e aí exerça a sua actividade biológica.

A administração parentérica envolve a utilização da proteína terapêutica em solução. No entanto, devido às suas condições intrínsecas, a maioria das proteínas são

instáveis em solução, tornando difícil a manutenção da sua actividade biofísica ao longo do tempo de armazenamento condicionando assim a sua utilização. De modo a evitar este obstáculo é usual adicionar agentes estabilizantes da solução proteica. Outro processo diferente para preservar a funcionalidade proteica durante o armazenamento assenta na obtenção de um liofilizado proteico. No entanto, é necessário frisar que as características físicas e químicas únicas de cada proteína condicionam a sua estabilidade pelo que é impossível prever qual o melhor método de armazenamento destes agentes terapêuticos. Deste modo, a identificação e caracterização dos processos físicos-químicos de degradação da proteína que se pretende utilizar é um passo essencial para poder delinear a estratégia de estabilização durante o processo de formulação, armazenamento e distribuição, de modo a manter a sua actividade biológica.

1.2. Proteínas em solução

Em solução, os processos que condicionam a estabilidade proteica podem ser de natureza física ou química. A instabilidade física das proteínas está relacionada com alterações na sua estrutura secundária, terciária ou quaternária e poderá conduzir à sua desnaturação e/ou agregação com consequente perda da actividade biológica e solubilidade.

Embora o mecanismo que conduz à formação de agregados não se encontre completamente esclarecido, pensa-se que este fenómeno ocorra sempre que seja necessário minimizar interações termodinamicamente desfavoráveis entre o solvente e os resíduos hidrófobos expostos na superfície proteica, quer por associação intermolecular de cadeias proteicas parcialmente desnaturadas quer por estabelecimento de interações entre conformações específicas de intermediários proteicos (Speed MA *et al*, 1996). Assim, factores físicos como a temperatura, a força iónica do meio, a agitação vigorosa, etc., podem conduzir a um aumento da hidrofobicidade da superfície proteica induzindo a formação de agregados.

Os agregados proteicos podem ser classificados como covalentes/não-covalentes, consoante a sua capacidade de redissolução na presença de agentes desnaturantes (agregados não-covalentes) ou solúveis/insolúveis. Os agregados solúveis podem ser identificados por cromatografia de exclusão molecular (SEC), enquanto que os agregados insolúveis podem ser detectados recorrendo à técnica de ultracentrifugação

ou dispersão dinâmica da luz (*dynamic light scattering*). Quando comparadas com os agregados insolúveis, as formas solúveis apresentam maior estabilidade, menor densidade e uma estrutura do tipo cristalina (mais ordenada).

A elevada instabilidade química das proteínas encontra-se directamente relacionada com o elevado número de grupos funcionais presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos constituintes, os quais constituem um alvo para a ocorrência de reacções químicas como a desamidação não enzimática, a hidrólise, a oxidação e a racemização. De entre estes processos a desamidação não enzimática e a oxidação constituem as alterações químicas mais frequentes que levam à degradação proteica.

A asparagina (Asn) e a glutamina (Gln) são os resíduos mais susceptíveis de sofrerem desamidação não enzimática, sendo convertidos em ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu), respectivamente. A ocorrência destas reacções está dependente não só do pH e temperatura do meio mas também da localização estrutural dos resíduos susceptíveis de sofrer desamidação. Assim, pH e temperaturas elevadas induzem a passagem de Asn e Gln a Asp e Glu, respectivamente. Por outro lado, quando aqueles resíduos se encontram localizados perto de hélices- α ou folhas- β a desamidação é mais difícil de ocorrer (Xie M e Schowen RL, 1999).

Presentemente, a desamidação não enzimática de resíduos de Asn e Gln encontra-se associada a um processo de “envelhecimento” da proteína que conduzirá à sua degradação e consequente perda da actividade biológica (Ekstrom F *et al*, 2006). Pensa-se que após desamidação a proteólise se encontre favorecida, uma vez que se sabe que as sequências contendo o resíduo Asp (por exemplo X-Asp-Y, sendo Y Gly ou Pro) são alvo preferencial de hidrólise da ligação peptídica (Powell MF, 1996).

A oxidação das proteínas em solução ocorre preferencialmente nos resíduos de histidina (His), metionina (Met), cisteína (Cys), Trp e Tyr. Esta reacção é potenciada na presença de peróxidos, iões metálicos de transição ou após exposição à luz directa, e depende do pH do meio (Wang W, 1999).

Como foi referido anteriormente, a manutenção da integridade e funcionalidade de proteínas em solução é por vezes atingida através da utilização de agentes estabilizantes, nomeadamente açúcares e polióis. O efeito estabilizador destes compostos depende não só da sua concentração mas também da proteína alvo. São recomendadas concentrações de açúcar/proteína numa razão de 0,34-0,4 (Tanaka K *et al*, 1991), enquanto que os polióis são geralmente utilizados em concentrações que variam entre 0,5 e 1 M. De entre os polióis mais utilizados salientamos o glicerol, o xilitol, o sorbitol e o manitol,

os quais têm sido descritos como agentes protectores de degradação química (Li S *et al*, 1996 a, b).

1.3. Liofilização de proteínas

A liofilização é o processo mais comum na preparação de proteínas como agentes terapêuticos (Cleland JL *et al*, 1993; Fox KC, 1995). No entanto, durante este processo estas macromoléculas são sujeitas a condições muito agressivas, resultantes essencialmente da congelação e desidratação (Wang W *et al*, 2000), pelo que nem todas as proteínas mantêm a estabilidade e integridade durante a liofilização. Assim, é usual recorrer à utilização de agentes adjuvantes, nomeadamente açúcares. Os açúcares mais utilizados pertencem à classe dos monossacáridos (por exemplo glucose, frutose e galactose) e dissacáridos (por exemplo sacarose, trealose, maltose e lactose). De um modo geral, os dissacáridos, e particularmente a sacarose e a trealose, são mais eficazes na sua capacidade de conservação de proteínas durante o processo de liofilização (Asay DB e Kim SH, 2006). A trealose tem a particularidade de apresentar uma maior temperatura de transição vítrea (*glass transition*) (Crowe LM e Crowe JH, 1992; Crowe LM *et al*, 1996), ser menos higroscópica, ser quimicamente menos reactiva e formar menor número de ligações de hidrogénio internas favorecendo a formação de ligações de hidrogénio com a proteína (Roser B, 1991), pelo que é aconselhável a sua utilização como agente adjuvante da liofilização.

Uma vez que um dos obstáculos à utilização da fenilalanina hidroxilase como agente terapêutico reside na sua elevada instabilidade, pretendemos com este trabalho investigar a aproximação mais eficaz para obter ao longo do tempo de armazenamento uma forma da proteína recombinante biologicamente activa. Assim, foram testados vários agentes estabilizantes, nomeadamente os polióis glicerol e manitol, o polímero PEG-6000 e os açúcares sacarose, trealose e glucose quer em soluções quer em liofilizados da proteína recombinante fenilalanina hidroxilase.

2. ENSAIOS DE ESTABILIDADE DA ENZIMA RECOMBINANTE 6xHis-hPAH EM SOLUÇÃO

Para proceder aos estudos de estabilidade da proteína 6xHis-hPAHwt em solução esta foi obtida por expressão heteróloga, recorrendo ao sistema pTrcHis (Parte II, parágrafo 2). Após purificação por IMAC a proteína recombinante apresentava um elevado grau de pureza ($\approx 98\%$) e uma massa molecular (M_r) de ≈ 55 kDa (Figura 1). Uma vez que a M_r do péptido de fusão (6xHis tag) é de ≈ 3 kDa, a massa molecular calculada para a proteína hPAHwt é de 52 kDa, valor que se encontra de acordo com os descritos na literatura (Kappock TJ e Caradona JP, 1996).

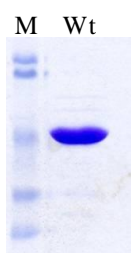


Figura 1- Análise por SDS-PAGE da proteína 6xHis hPAHwt recombinante obtida por expressão heteróloga no sistema pTrcHis. (M) Marcador de massas moleculares *Pre-stained Low Range*; (Wt) proteína 6xHis-hPAHwt recombinante após purificação por IMAC.

Uma vez verificado o grau de pureza e determinada a concentração da proteína obtida, procedeu-se ao seu armazenamento, durante 30 dias, às temperaturas de 4°C e -20°C, na presença de diferentes agentes estabilizantes, nomeadamente os polióis glicerol (50%) e manitol (10%), os dissacáridos sacarose (5%) e trealose (5%) e o polímero PEG-6000 (30%). Foi ainda estudada uma amostra de 6xHis-hPAHwt armazenada em tampão (ausência de agentes estabilizantes). Ao longo do tempo de armazenamento (8 dias, 15 dias e 30 dias) a integridade e funcionalidade da proteína foi analisada. Deste modo, foi avaliada a quantidade de proteína em solução, a presença de produtos de degradação (SDS-PAGE), a actividade enzimática, o perfil de oligomerização e a ocorrência de desnaturação.

2.1. Teor proteico

Quando armazenada na ausência de agentes estabilizantes, a 4°C, o teor de 6xHis-hPAHwt decresce drasticamente a partir dos 15 dias de armazenamento, sendo impossível quantificar proteína em solução (figura 2). A esta temperatura foi constatado que na presença de PEG-6000 a 30% e glicerol a 50% a perda de proteína ocorre logo após 48h de armazenamento uma vez que foi possível recuperar apenas $46,5\% \pm 10,5$ e $57\% \pm 2$, de 6xHis-hPAHwt, respectivamente. Após 15 dias de armazenamento a 4°C, foi possível detectar apenas $5\% \pm 2$ de proteína inicial na solução de PEG-6000. Findo este tempo o glicerol a 50% e a sacarose a 5% apresentam uma capacidade protectora semelhante que rondava os 20% de recuperação ($20,5\% \pm 4,5$ e $20\% \pm 5,3$), enquanto que o manitol a 10% e a trealose a 5% permitiram recuperar $46,5\% \pm 5,5$ e $40\% \pm 8,7$ de 6xHis-hPAHwt respectivamente. De um modo geral, a presença dos agentes estabilizantes estudados não foi eficaz na manutenção do teor de 6xHis-hPAHwt em solução uma vez que após 1 mês de armazenamento ocorreu perda quase total da proteína em solução independentemente do estabilizante utilizado (figura 2).

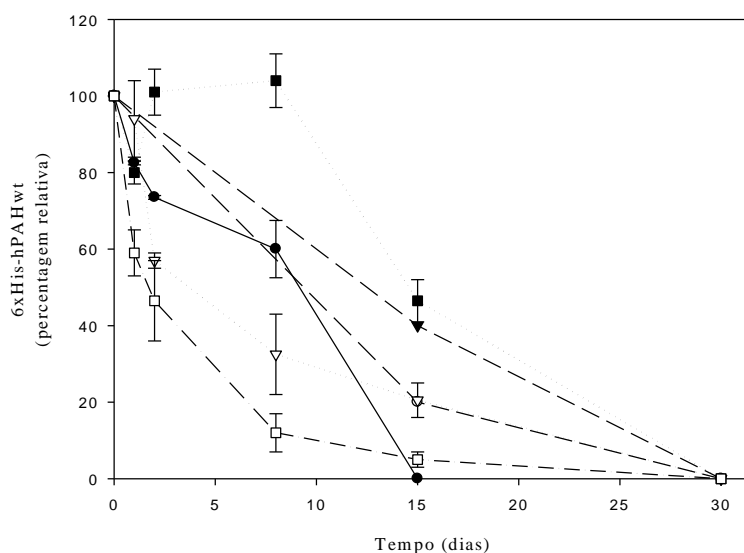


Figura 2 - Variação da quantidade de 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a 4°C, na ausência (-●-) e na presença de diferentes agentes estabilizantes. (-○-) sacarose a 5%; (-▼-) trealose a 5%; (-▽-) glicerol a 50%; (-■-) manitol a 10%; (-□-) PEG-6000 a 30%. A quantidade de proteína 6xHis-hPAHwt no tempo zero de armazenamento foi considerada como 100%. Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

Pela análise do perfil electroforético (figura 3) das amostras armazenadas a 4°C, na presença de glicerol a 50%, sacarose a 5% e trealose a 5%, podemos concluir que a perda de proteína durante o tempo de armazenamento, que é evidente logo após os 15 dias, encontra-se directamente relacionada com o aparecimento de espécies proteicas de menor massa molecular e que poderão resultar da proteólise da proteína recombinante. No entanto, na presença do PEG-6000 a 30% e do manitol a 10% a perda de 6xHis-hPAHwt não é acompanhada pelo aparecimento daquelas bandas (figura 3). Nesta situação, o desaparecimento da fenilalanina hidroxilase recombinante poderá estar relacionada com a formação de agregados insolúveis que serão removidos aquando da centrifugação que é efectuada antes da aplicação da amostra no gel SDS-PAGE.

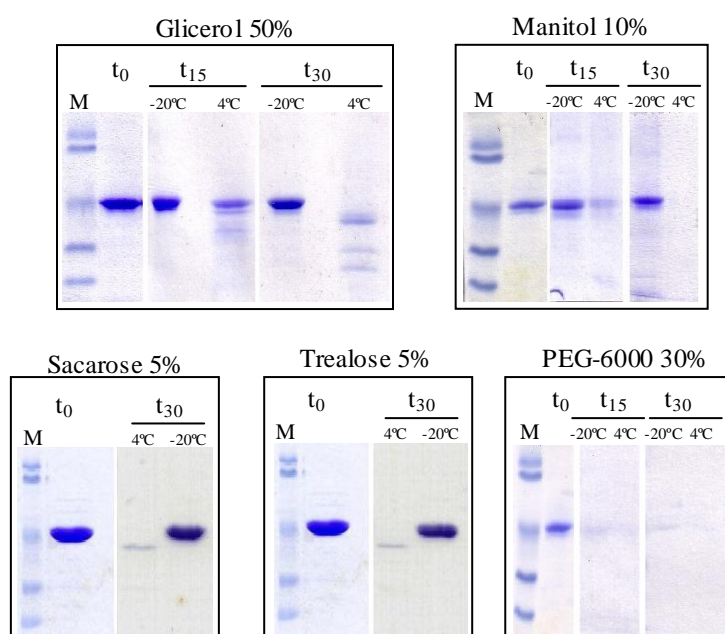


Figura 3 – Análise por SDS-PAGE, ao longo do tempo de armazenamento, da proteína 6xHis-hPAHwt conservada em Glicerol a 50%, Manitol a 10%, PEG-6000 a 30%, sacarose a 5% e trealose a 5% (5), às temperaturas de 4°C e -20°C. (M) Marcador de massas moleculares *Pre-stained Low Range*; (t₀) proteína após purificação; (t₁₅) após 15 dias de armazenamento; (t₃₀) após 30 dias de armazenamento.

Uma vez que os produtos de menor massa molecular poderão constituir produtos de degradação proteica resultantes da acção de possíveis proteases existentes no meio reaccional, estes ensaios foram realizados incluindo no meio de armazenamento um *cocktail* de inibidores de proteases constituído por fluoreto de 4-(2-amino-

etil)benzenosulfonil, aprotinina, E-64, EDTA e hemissulfato de leupeptina. No entanto, este conjunto de inibidores de proteases não contribuiu para a manutenção do teor proteico das soluções em estudo nem para o desaparecimento das espécies de menor massa molecular, o que parece indicar que a hidrólise química é o mecanismo que se encontra na base da instabilidade observada.

À temperatura de -20°C é indispensável a presença de agentes estabilizadores, uma vez que o teor proteico da solução de amostra armazenada em tampão, após descongelamento, foi nulo sendo detectados agregados, visíveis a olho nu. A quantificação do teor proteico das soluções com estabilizantes (figura 4) revelou que o efeito protector destes agentes é mais eficaz à temperatura de -20°C . Enquanto que o PEG-6000 a 30% continua a não ter capacidade para manter a 6xHis-hPAHwt em solução, o glicerol a 50% assegura a manutenção de $41,5\% \pm 3,5$ de proteína ao fim de 30 dias de armazenamento. O manitol a 10%, a sacarose a 5% e a trealose a 5%, a -20°C , são os agentes estabilizantes mais eficazes, com valores de $90,5\% \pm 5,5$, $97,3 \pm 6,9$ e $104\% \pm 7,2$, respectivamente (figura 4).

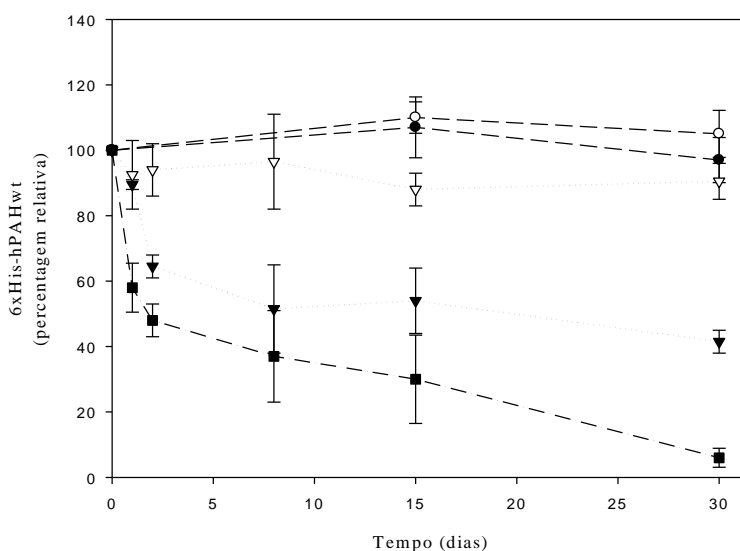


Figura 4 - Variação da quantidade de 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a -20°C , na presença de diferentes agentes estabilizantes. (— ● —) sacarose a 5%; (— ○ —) trealose a 5%; (●●▼●●) glicerol a 50%; (●●▽●●) manitol a 10%; e (— ■ —) PEG-6000 a 30%. A quantidade de proteína 6xHis-hPAH wt no tempo zero de armazenamento foi considerada como 100%. Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

É ainda de referir que, a análise do perfil electroforético das amostras de 6xHis-hPAHwt armazenadas a -20°C , em soluções contendo glicerol a 50%, manitol a 10%, sacarose a 5% e trealose a 5% (figura 3), não revelou a presença de fragmentos proteicos de massa molecular inferior a 55 kDa pelo que se pode concluir que na presença destes agentes não ocorre proteólise.

2.2. Actividade enzimática

A determinação da funcionalidade da proteína é um parâmetro crucial no estudo de estabilidade, uma vez que o objectivo principal dos estudos de estabilização proteica consiste na manutenção da função biológica destas macromoléculas.

Assim, a avaliação da actividade enzimática da 6xHis-hPAHwt permitiu confirmar que à temperatura de 4°C , o desaparecimento da proteína em solução é também acompanhado por um decréscimo da sua função biológica (figura 5).

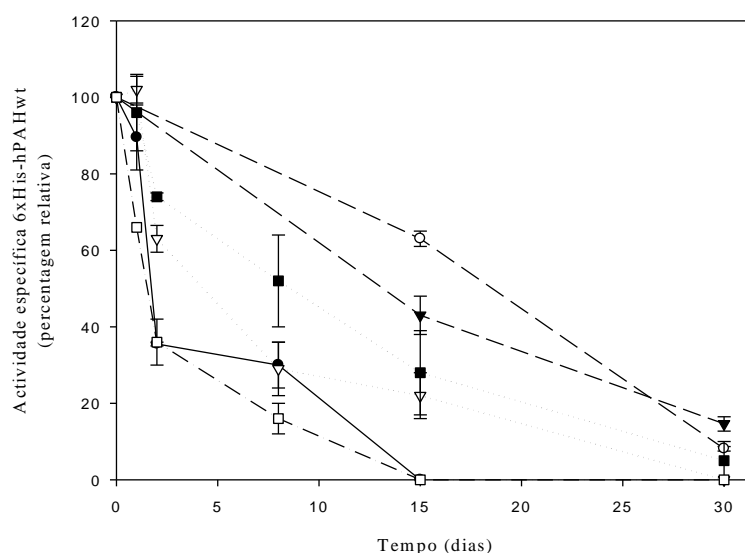


Figura 5 - Variação da actividade residual da 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a 4°C , na ausência (—●—) e na presença de diferentes agentes estabilizantes. (—○—) sacarose a 5%; (—▼—) trealose a 5%; (—●▽—) glicerol a 50%; (—●■—) manitol a 10%; (—●□—) PEG-6000 a 30%. (A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μM 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

Na ausência de estabilizantes a actividade da 6xHis-hPAHwt é nula após 15 dias de armazenamento. No entanto, à excepção do PEG-6000, a presença do glicerol a 50%, manitol a 10%, sacarose a 5% ou trealose a 5%, contribui para que a diminuição ocorra mais tarde, ou seja por volta dos 30 dias. Deste modo, após 1 mês de armazenamento foi possível recuperar apenas $5\% \pm 5$; $8,1\% \pm 0,6$ e $14,6\% \pm 1,9$ de actividade residual da 6xHis-hPAHwt quando esta se encontrava numa solução de manitol a 10%, sacarose a 5% e trealose a 5%, respectivamente.

O estudo da recuperação da actividade residual da 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a -20°C , na presença de agentes estabilizantes mostrou que, apenas a esta temperatura, alguns destes agentes são eficazes na preservação da funcionalidade da proteína 6xHis-hPAHwt. Pela análise da figura 6 é possível constatar que após 30 dias a proteína recombinante manteve cerca de $83\% \pm 2,5$ e $70\% \pm 10$ de actividade na presença de glicerol a 50% e manitol a 10%, respectivamente. Os melhores resultados foram no entanto obtidos com os dissacáridos tendo sido possível obter cerca de $100\% \pm 2,5$ e $90\% \pm 3,4$ de actividade na presença de sacarose a 5% e trealose a 5%, respectivamente.

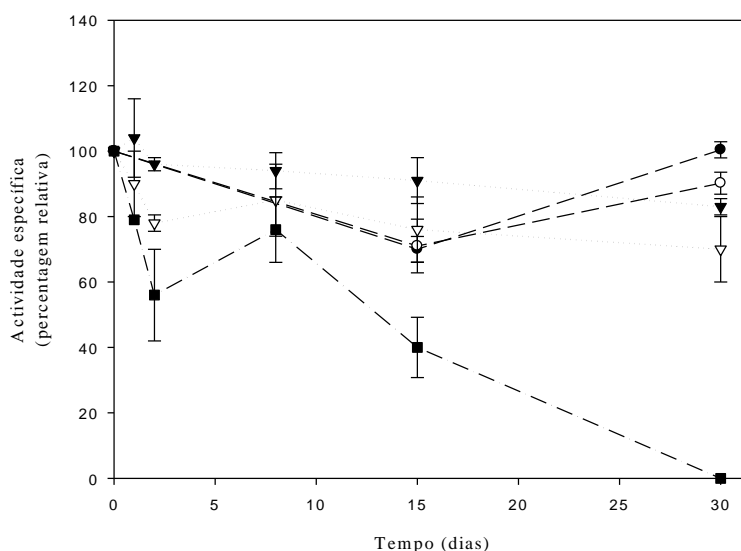


Figura 6 - Variação da actividade residual da 6xHis-hPAHwt ao longo do tempo de armazenamento, a -20°C , na presença de diferentes agentes estabilizantes. (—●—) sacarose a 5%; (—○—) trealose a 5%; (···▼···) glicerol a 50%; (···▽···) manitol a 10%; e (—■—) PEG-6000 a 30%. (A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μM 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

2.3. Avaliação do estado de desnaturação

A proteína hPAH apresenta um elevado número de resíduos com anéis aromáticos, nomeadamente três resíduos de triptofano (Trp120, Trp187 e Trp326) e 22 resíduos de tirosina, os quais contribuem para que esta enzima apresente um espectro de fluorescência característico (Kleppe R *et al*, 1999). Após desnaturação os resíduos de triptofano que se encontravam no interior da proteína, num ambiente hidrófobo, ficam expostos ao solvente (ambiente hidrófilo) induzindo um deslocamento no comprimento de onda máximo de emissão (quando excitada a 295 nm) de ≈ 335 nm para ≈ 355 nm (Knappskog PM e Haavik J, 1995). Assim, a análise do espectro de fluorescência da hPAH permite avaliar o seu grau de desnaturação.

À semelhança do descrito para a hPAH, a proteína 6xHis-hPAHwt recombinante apresenta o seu máximo de emissão a 335 nm (λ_{exc} 295 nm), o qual é deslocado para ≈ 360 nm (λ_{exc} 295 nm) após desnaturação pelo cloreto de guanidina a 6 M (figura 7).

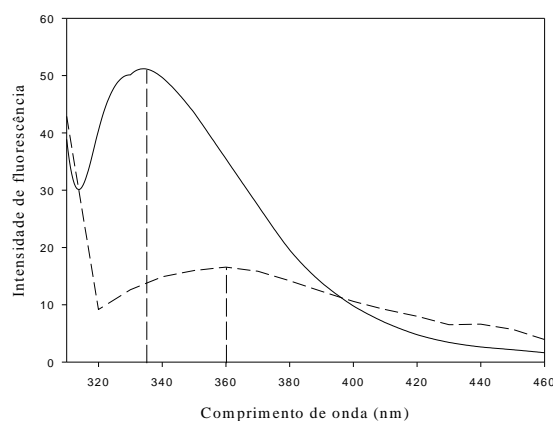


Figura 7 – Espectros de fluorescência da proteína 6xHis-hPAHwt na forma nativa (—) e após desnaturação com cloreto de guanidina 6 M (---). Os comprimentos de onda de 335 e 360 nm encontram-se assinalados. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 295 nm.

Assim, o grau de desnaturação da proteína 6xHis-hPAHwt armazenada a diferentes temperaturas, na presença dos diferentes agentes estabilizantes estudados foi

monitorizado, através da análise dos espectros de emissão de fluorescência (λ_{exc} 295 nm) aos 30 dias de armazenamento (figura 8).

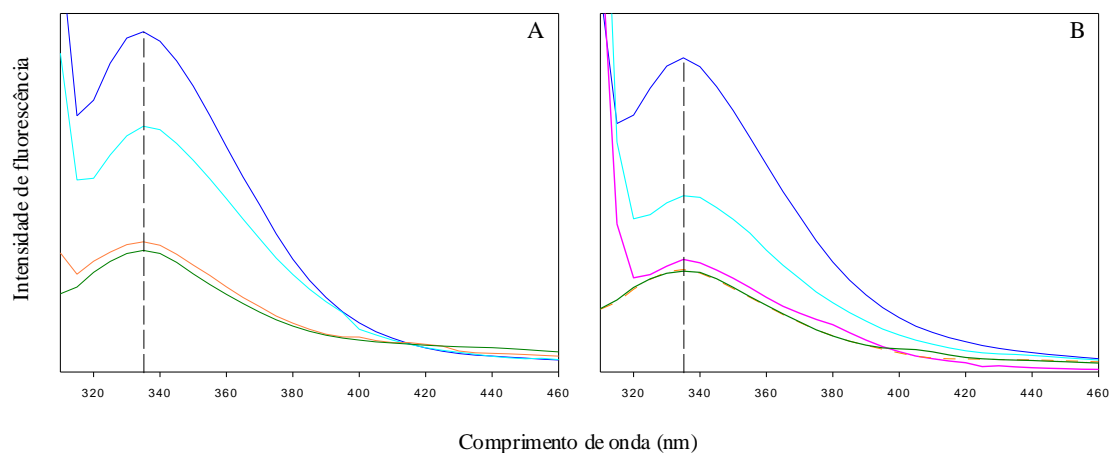


Figura 8 – Espectros de fluorescência da proteína 6xHis-hPAHwt, após 30 dias de armazenamento, a 4°C (A) e a -20°C (B) na presença dos agentes estabilizantes em estudo: (—) glicerol a 50%; (—) manitol a 10%; (—) PEG-6000 a 30%; (—) sacarose a 10%; (—) trealose a 10%. O comprimento de onda de 335 nm encontra-se assinalado. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 295 nm.

A análise da figura 8 revela que não houve alterações no comprimento de onda máximo de emissão, em nenhuma das condições testadas, quer em função do agente estabilizante, quer em função da temperatura de armazenamento de 4°C (figura 8A) ou de -20°C (figura 8B). É de referir que foi possível determinar os espectros de emissão de fluorescência da 6xHis-hPAH wt armazenada a 4°C, uma vez que esta foi utilizada em todos os ensaios a uma concentração de 40 µg/ml. Estes resultados indicam que não há ocorrência de desnaturação, o que sugere que as principais alterações ocorridas ao longo do tempo, nomeadamente a perda de actividade, não sejam devidas à desnaturação proteica.

2.4. Avaliação do estado de oligomerização

A proteína 6xHis hPAHwt recombinante foi analisada por cromatografia de exclusão molecular de alta resolução (HPLC-SEC), com o objectivo de determinar o seu estado de oligomerização. Para calcular a massa molecular das espécies proteicas

presentes foi construída uma curva de calibração utilizando o tempo de retenção (T_R) dos componentes da solução padrão (figura 9A). A análise cromatográfica permitiu ainda determinar a quantidade relativa (%) das diferentes formas oligoméricas da proteína recombinante.

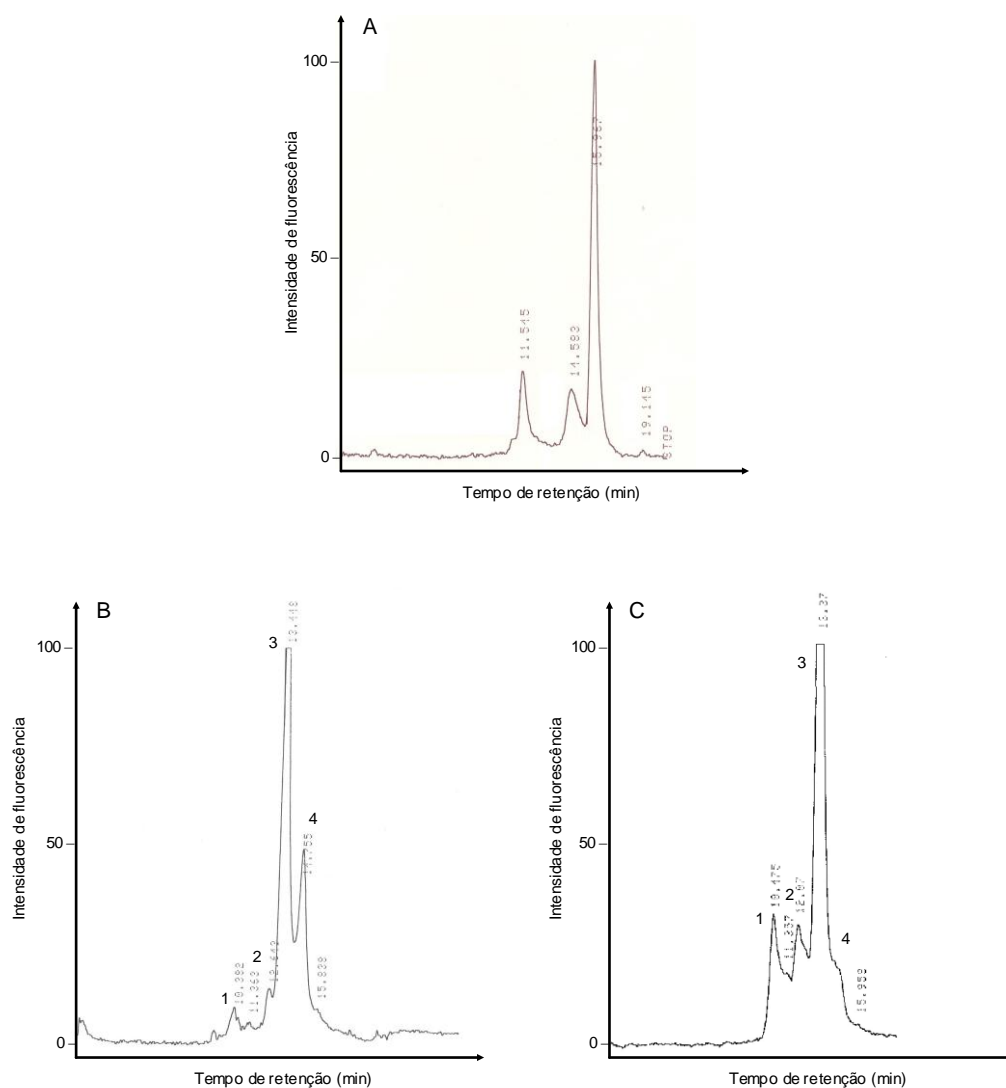


Figura 9 – Cromatografia de exclusão molecular de alta resolução (HPLC-SEC) de uma solução de padrão de massas moleculares *Gel filtration standard* (A) e da proteína 6xHis-hPAHwt recombinante sem pré-incubação com a L-Phe (B) e após pré-incubação com a L-Phe (C). (1) formas agregadas; (2) formas hexaméricas; (3) formas tetraméricas; (4) formas diméricas.

Os resultados obtidos (tabela 1; figura 9B e 9C) permitiram verificar que o perfil de oligomerização da 6xHis-hPAHwt é semelhante ao descrito na literatura para outras formas de fenilalanina hidroxilase recombinantes (Knappskog PM *et al*, 1996; Bjorgo E *et al*, 2001). Assim, após purificação a 6xHis-hPAHwt apresenta cerca de 18% de agregados, 56% de formas tetraméricas e 16% de dímeros. Na presença do substrato L-Phe o equilíbrio tetrâmero \leftrightarrow dímero foi deslocado para as formas tetraméricas que constituem, nestas condições, cerca de 75% das formas presentes (tabela 1). Não foi possível identificar formas monoméricas, o que indica que o processo de purificação não conduz à perda do estado de oligomerização necessário à manutenção da função catalítica.

Tabela 1 - Massa molecular e percentagem relativa das diversas formas oligoméricas apresentadas pela proteína 6xHis-hPAHwt recombinante após purificação

	Massa molecular (kDa)	Percentagem relativa	
		Sem pré-activação pela L-Phe	Com pré-activação pela L-Phe
Agregados	> 600	18	16
Hexâmeros/octâmeros	≈ 330/440	10	4
Tetrâmeros	≈ 220	56	75
Dímeros	≈ 110	16	5
Monómeros	≈ 55	-	-

Nota: De acordo com Knappskog PM e Bjorgo E (Knappskog PM *et al*, 1996; Bjorgo E *et al*, 2001), sem pré-activação pela L-Phe, a proteína hPAHwt apresenta 27% de formas agregadas, 60% de formas tetraméricas e 35% de formas diméricas.

O perfil de oligomerização da proteína recombinante ao longo do período de armazenamento a -20°C , na presença de glicerol 50%, manitol a 10% ou dos dissacáridos (trelose e sacarose) a 5%, foi analisado e comparado com o obtido após purificação, na ausência de estabilizantes (figura 9, tabela 1). Foram seleccionadas estas condições uma vez que foram aquelas que permitiram não só manter o teor de proteína em solução (figura 4), mas também a sua actividade enzimática (figura 6). Curiosamente, quando se procedeu à separação cromatográfica (SEC-HPLC) da amostra armazenada na presença de PEG-6000 apenas foram identificadas formas agregadas. Este resultado, que pode explicar o motivo pelo qual não foi possível obter proteína em solução (figura 3), poderá estar relacionado com o facto de que o PEG-6000 se encontrar referido como agente precipitante de algumas proteínas (Sharma VK e Kalonia DS, 2004).

A percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas é apresenta na figura 10.

De um modo geral, podemos concluir que a presença dos agentes estabilizantes na solução proteica evita a formação de agregados solúveis da 6xHis-hPAHwt (figura 10 A).

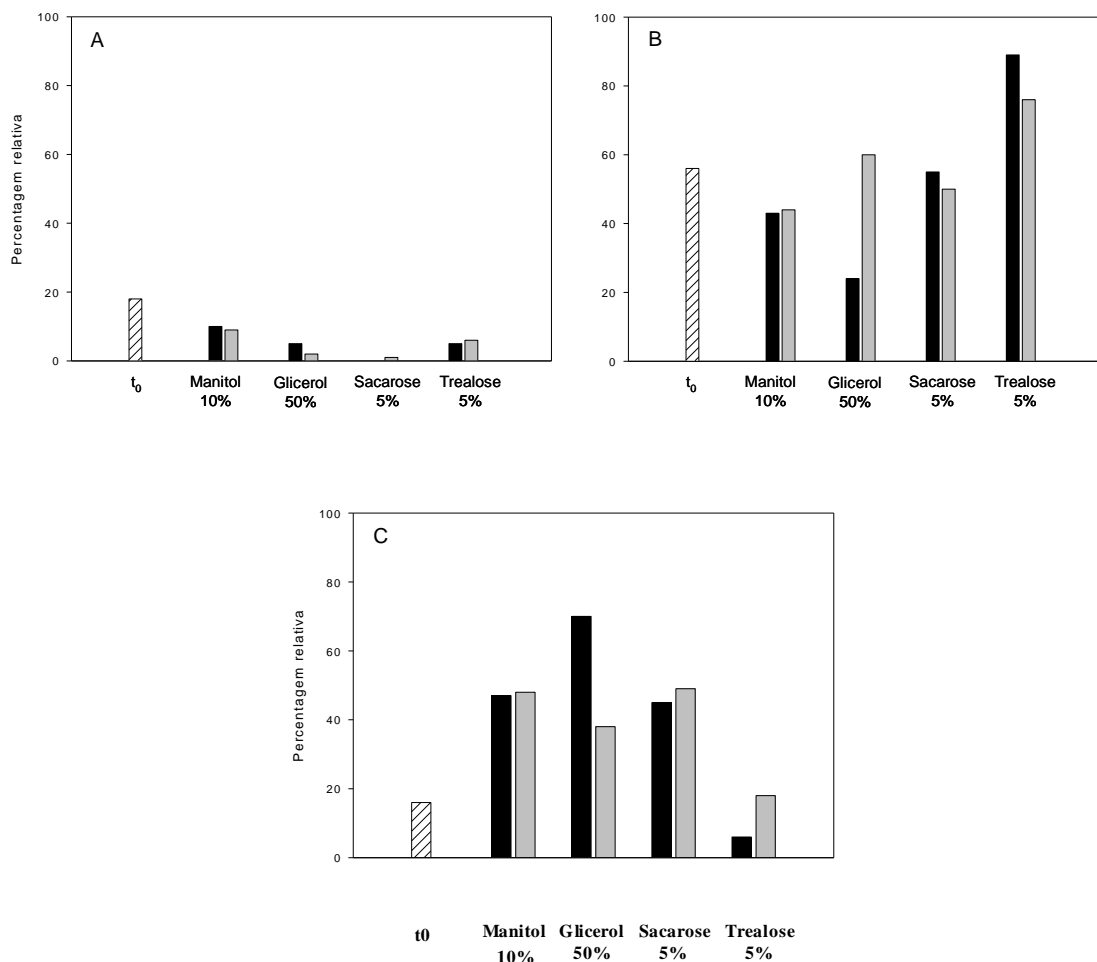


Figura 10 – Análise comparativa do estado de oligomerização da proteína 6xHis-hPAHwt recombinante, conservada a -20°C , ao fim de 15 dias (■) e ao fim de 30 dias (▒) na presença dos vários adjuvantes em estudo (manitol a 10%, glicerol a 50%, trealose a 5% e sacarose a 5%). A) Formas agregadas; B) Formas tetraméricas e C) Formas diméricas. t_0 representa a proteína após purificação, antes do armazenamento.

Enquanto que após purificação (t_0) em solução tampão a proteína recombinante apresenta 18% de formas agregadas, na presença dos compostos em estudo e ao longo do tempo de armazenamento, obtiveram-se valores de formas agregadas de aproximadamente 10% para o manitol a 10%, de 4% para o glicerol a 50%, de 1% para a sacarose a 5% e de 6% para a trealose a 5% (figura 10A).

Ao longo do tempo de armazenamento a -20°C , e quando comparados com a solução controlo (t_0), entre si os agentes estabilizantes estudados parecem exercer efeitos diferentes. À excepção do glicerol (24 e 60% de formas tetraméricas aos 15 e 30

dias, respectivamente), na presença de manitol, sacarose e trealose não foi observada uma variação significativa ao longo do tempo de armazenamento. Deste modo, a percentagem relativa de formas tetraméricas após 15 dias e 30 dias de armazenamento numa solução contendo 10% de manitol foi de 43 e 44%, respectivamente; numa solução de sacarose a 5% foi de 55 e 50%, respectivamente; e numa solução de trealose a 5% foi de 89 e 76% respectivamente. De acordo com os resultados obtidos convém salientar que a trealose a 5% parece estabilizar o tetrâmero da 6xHis-hPAHwt, uma vez que é possível recuperar cerca de 80% destas formas em solução (figura 10B).

De um modo geral, em nenhuma das amostras examinadas foram identificadas formas monoméricas. No entanto, todas elas apresentaram formas oligoméricas que, de acordo com a massa molecular determinada (≈ 330 -440 kDa), parecem corresponder a formas hexaméricas ou octaméricas. É de salientar que se encontra ainda por esclarecer quer o papel biológico quer as características enzimáticas destas formas oligoméricas.

O perfil de oligomerização da 6xHis-hPAHwt ao fim de 30 dias de armazenamento a -20°C na presença de glicerol a 50%, manitol a 10% e sacarose e trealose a 5%, após pré-incubação com o substrato L-Phe foi também determinado (tabela 2).

Tabela 2 – Percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas da 6xHis-hPAHwt, com e sem incubação pelo substrato L-Phe, após 30 dias de armazenamento a -20°C na presença de diferentes agentes estabilizantes.

	Pré-incubação (L-Phe)	Percentagem relativa		
		Agregados	Tetrâmeros	Dímeros
Tampão ⁽¹⁾	-	18	56	16
	+	16	75	5
Glicerol 50%	-	2	60	38
	+	6	70	25
Manitol 10%	-	9	44	48
	+	3	77	20
Sacarose 5%	-	1	50	49
	+	4	56	40
Trealose 5%	-	6	76	18
	+	8	78	14

⁽¹⁾ Ensaio efectuado após purificação da 6xHis-hPAHwt.

Os resultados obtidos indicam que, após 30 dias de armazenamento a -20°C apenas na presença do glicerol a 50% e do manitol a 10% foi possível observar o deslocamento típico no perfil de oligomerização, com o enriquecimento na fracção de

formas tetraméricas. Como seria de esperar, e uma vez que na presença de trealose a 5%, a proteína apresenta-se já maioritariamente na forma tetramérica, não foi observado deslocamento no equilíbrio dímero \leftrightarrow tetrâmero após incubação pela L-Phe. Curiosamente quando armazenada na presença de sacarose a 5% também não foi possível observar alteração no estado de equilíbrio.

2.5. Propriedades enzimáticas

Uma vez que a presença dos diferentes agentes estabilizantes parece alterar o perfil de oligomerização da proteína 6xHis-hPAHwt, foram determinadas algumas das propriedades enzimáticas da proteína recombinante. Estes ensaios foram efectuados para a proteína armazenada na presença do glicerol a 50% e do manitol a 10% uma vez que estes agentes, após 30 dias de conservação a -20°C , parecem induzir um estado oligomérico semelhante ao observado após purificação da proteína (t_0).

Uma das características mais importantes da enzima 6xHis-hPAHwt (figura 11) recombinante é a sua cooperatividade para o substrato, que se traduz numa resposta sigmoide a concentrações crescentes de L-Phe. Aliada a esta resposta, a hPAH é inibida a concentrações elevadas de L-Phe (Phillips RS e Kaufman S, 1984; Pey AL e Martinez A, 2005).

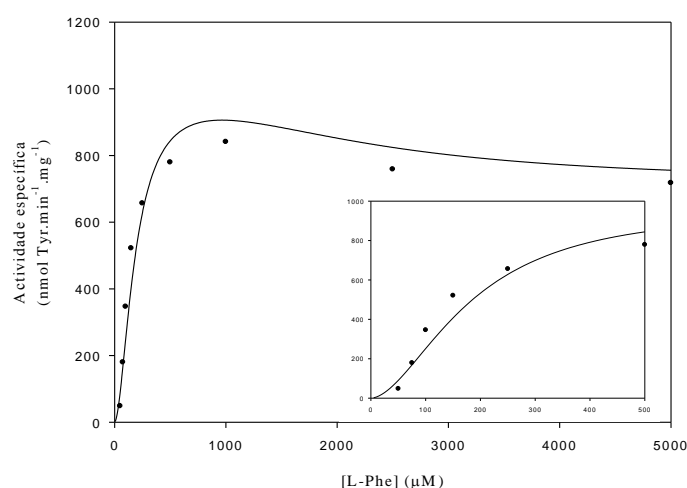


Figura 11 – Efeito da concentração do substrato (L-Phe) na actividade catalítica da enzima 6xHis-hPAHwt após purificação (t_0). Para cada amostra apresenta-se em pormenor a resposta da enzima para as concentrações de L-Phe de 0-500 μM . Os ensaios foram efectuados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 75 μM BH_4).

Para melhor comparar as possíveis alterações, induzidas pelo manitol e pelo glicerol, nas propriedades enzimáticas da 6xHis hPAHwt, o efeito da variação do substrato L-Phe foi monitorizado em amostras proteicas logo após purificação (t_0) em solução de glicerol a 50% ou de manitol a 10% (figura 12).

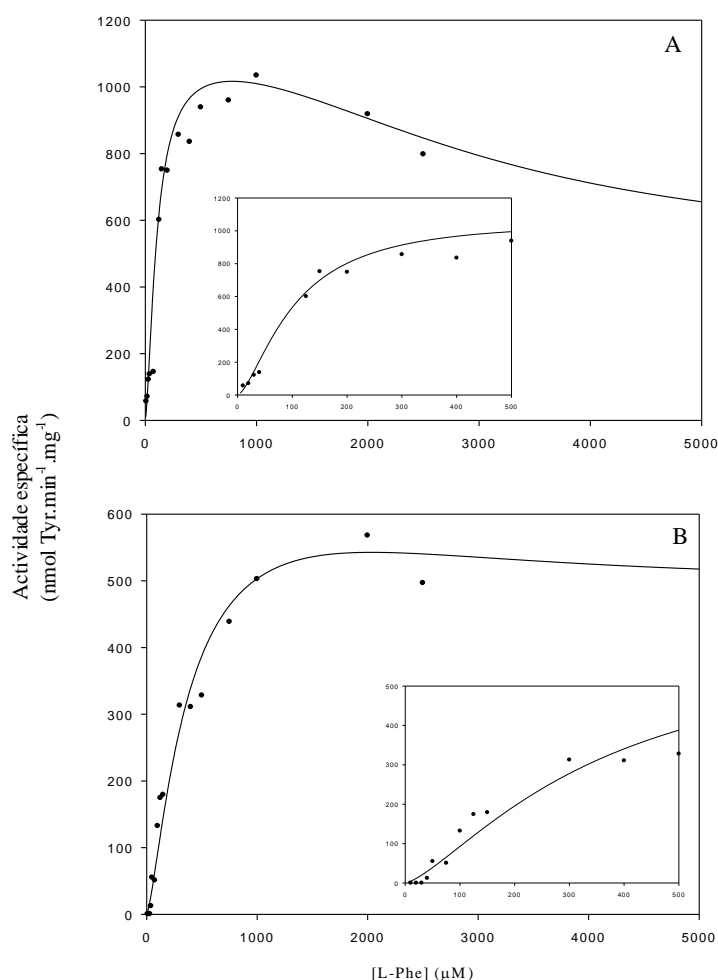


Figura 12 – Efeito da concentração do substrato (L-Phe) na actividade catalítica da enzima 6xHis-hPAHwt numa solução de glicerol a 50% (A) e manitol a 10% (B) após purificação (t_0). Para cada amostra apresenta-se em pormenor a resposta da enzima para as concentrações de L-Phe de 0-500 µM. Os ensaios foram efectuados em condições padronizadas (75 µM BH₄).

Os resultados obtidos demonstram que na presença de glicerol a 50% a enzima parece manter o valor do V_{max} , o seu perfil sigmoidal e a inibição por concentrações elevadas de substrato (figura 12A; tabela 3). No entanto, na presença de manitol a

resposta sigmoideal não é tão acentuada, assim como é menor a inibição pelo substrato e o valor de V_{\max} (figura 12B; tabela 3).

Relativamente à resposta da 6xHis-hPAHwt a concentrações crescentes do substrato, após 30 dias de armazenamento, na presença de glicerol a 50% ou de manitol a 10% (figura 13; tabela 3), foi observada uma manutenção na resposta sigmoideal bem como na inibição por concentrações elevadas de substrato.

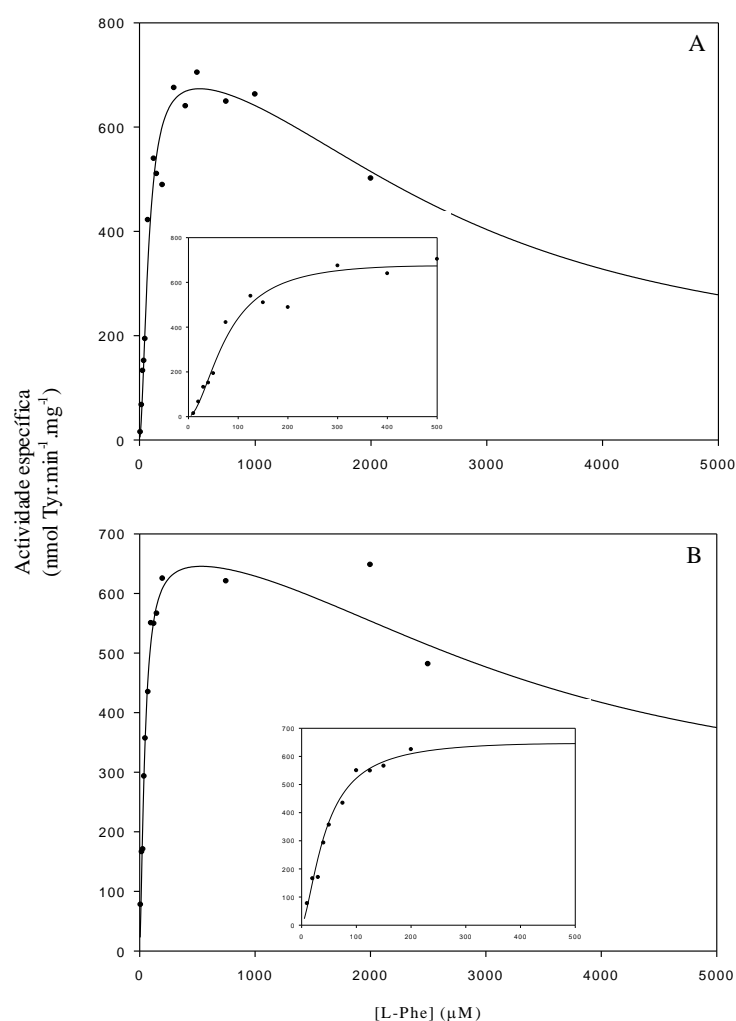


Figura 13 – Efeito da concentração do substrato (L-Phe) na actividade catalítica da enzima 6xHis-hPAHwt numa solução de glicerol a 50% (A) e manitol a 10% (B) após 30 dias de armazenamento a - 20°C. Para cada amostra apresenta-se em pormenor a resposta da enzima para as concentrações de L-Phe de 0-500 μM. Os ensaios foram efectuados em condições padronizadas (75 μM BH₄).

A determinação dos parâmetros de V_{\max} , coeficiente de Hill (h) e $S_{0,5}$ permitiram confirmar as observações anteriores (tabela 2). Na realidade, quando comparado com a V_{\max} obtida para a amostra após purificação e na presença de tampão (1000 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹), na presença de glicerol (t_0) a V_{\max} não sofre alterações significativas (1100 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹), enquanto que na presença de manitol a 10% a V_{\max} determinada é significativamente mais baixa (642 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹). Relativamente à afinidade da enzima para o substrato ($S_{0,5}$ de 186 µM, em tampão) esta é ligeiramente superior na presença de glicerol a 50% (104 µM) e significativamente inferior numa solução de manitol a 10%. Na presença de glicerol e de manitol, a 6xHis-hPAHwt apresenta menor cooperatividade que se traduz por um valor de h de 1,5 e de 1,4, respectivamente. Estes resultados traduzem-se numa maior eficiência catalítica ($K_{\text{cat}}/S_{0,5}$) da fenilalanina hidroxilase recombinante quando numa solução de glicerol a 50%, que passa de 0,29 para 0,58 µM⁻¹.min⁻¹. Quando o manitol está presente na solução proteica a eficiência catalítica desce para 0,10 µM⁻¹.min⁻¹.

Tabela 3 – Propriedades enzimáticas da 6xHis-hPAHwt recombinante em diferentes soluções, após purificação (t_0) e após 30 dias de armazenamento (t_{30}) a -20°C na presença de glicerol a 50% e manitol a 10%.

	V_{\max} (nmolTyr.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	$S_{0,5}$ L-Phe (µM)	h	$K_{\text{cat}}/S_{0,5}$ ⁽¹⁾ (µM ⁻¹ .min ⁻¹)
Tampão	1000	186	1,8	0,29
Glicerol 50% (t_0)	1100	104	1,5	0,59
Manitol 10% (t_0)	642	355	1,4	0,10
Glicerol 50% (t_{30})	714	77	1,6	0,52
Manitol 10% (t_{30})	670	45	1,5	0,83

⁽¹⁾ Eficiência catalítica (determinada considerando a MM do monómero de 6xHis-hPAH de 55 kDa).

Relativamente ao t_0 os parâmetros cinéticos determinados sofreram alterações significativas, aproximando-se entre si (tabela 3). Deste modo, a afinidade aumentou consideravelmente, quer para o glicerol a 50% ($S_{0,5}$ de 77 µM) quer para o manitol a 10% ($S_{0,5}$ de 45 µM) e os valores de V_{\max} e de h também foram semelhantes. Na presença de glicerol, ao fim de 30 dias de armazenamento a eficiência catalítica da enzima manteve-se (0,52 µM⁻¹.min⁻¹) uma vez que simultaneamente ocorreu uma diminuição do $S_{0,5}$ e da V_{\max} (de 1100 para 714 nmol Tyr.min⁻¹.mg⁻¹). Após 1 mês de

armazenamento, a -20°C , na presença de manitol a eficiência catalítica também aumentou consideravelmente (de 0,10 para $0,83 \mu\text{M}^{-1}.\text{min}^{-1}$) devido essencialmente ao aumento da afinidade da enzima para o substrato.

2.6. Proteólise limitada

O grau de resistência da hPAH à acção da tripsina (proteólise limitada) tem sido utilizado como informação adicional quanto ao estado conformacional daquela enzima. Estruturas mais “abertas” têm sido associadas a uma diminuição da resistência à proteólise limitada com a tripsina (Solstad T *et al*, 2000; Bjorgo E *et al*, 1998).

Os resultados obtidos para a proteína 6xHis-hPAHwt (figura 14) indicam que quando armazenada em tampão após ≈ 18 min é possível recuperar cerca de 50% da forma intacta da 6xHis-hPAH wt. Embora nos minutos iniciais, na presença de manitol, a taxa de degradação seja mais rápida, o tempo de proteólise de 50% da proteína recombinante mantém-se nos 18 minutos. No entanto ao fim de 60 min de reacção, na presença deste agente estabilizante a quantidade proteína recuperada é ligeiramente superior à da proteína 6xHis-hPAH wt após purificação. O glicerol a 50% parece induzir uma maior resistência à proteólise uma vez que o tempo necessário para degradar 50% de 6xHis-hPAH wt passa para ≈ 30 min, embora pareça não proteger a enzima ao longo do tempo de proteólise, visto que a proteína recuperada após 60 min é inferior à da 6xHis-hPAHwt armazenada em tampão.

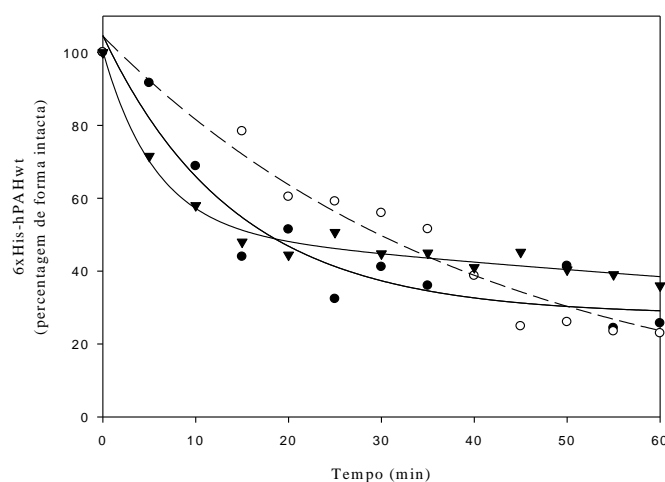


Figura 14 – Resistência à proteólise da 6xHis-hPAHwt após purificação (●) e após 30 dias de armazenamento a -20°C na presença de glicerol a 50% (◐) ou manitol a 10% (▼).

Estes dados poderão indicar que a proteína armazenada na presença de manitol ou de glicerol se encontra mais susceptível à acção da proteólise com tripsina, sugerindo a presença de uma estrutura proteica mais “aberta”.

2.7. Acessibilidade dos resíduos de triptofano

A utilização de solutos que diminuam o *quantum yield* das proteínas, por *quenching* colisional, possibilita a determinação do grau de exposição dos resíduos de Trp ao solvente e assim obter informação acerca da conformação proteica. De entre os compostos utilizados como *quenchers* salientamos a acrilamida e o KI. Enquanto que a acrilamida é uma molécula pequena, polar não carregada, que pode penetrar na matriz proteica, o KI é uma molécula polar, carregada negativamente e que por esta razão apenas consegue interagir com os resíduos de Trp da superfície proteica. Assim, a determinação da intensidade de fluorescência de uma proteína quando na presença de concentrações crescentes de KI ou de acrilamida (Parte II, parágrafo 5.7.3) permite calcular a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e a fracção acessível ao *quencher* (f_a), parâmetros que fornecem informações importantes acerca estrutura terciária da proteína.

Na presença de KI, a 6xHis-hPAHwt apresentou, nos gráficos de Stern-Volmer, curvas de *quenching* não-lineares típicas de proteínas constituídas por uma população de resíduos de Trp com diferentes acessibilidades (tabela 4). A aplicação da equação modificada de Stern-Volmer (equação 3) tornou possível calcular os parâmetros K_{SV} e f_a , os quais são apresentados na tabela 4. Relativamente aos gráficos de Stern-Volmer obtidos com a acrilamida, estes apresentaram um desvio ascendente o qual é devido à activação da hPAH pelo próprio *quencher* (Knappskog PM *et al*, 1995).

Tabela 4 – Constantes de quenching e fracção acessível ao quenching da 6xHis-hPAHwt recombinante em diferentes soluções, após purificação (t_0) e após 30 dias de armazenamento (t_{30}) a -20°C na presença de glicerol a 50% e manitol a 10%.

	KI		Acrilamida
	f_a	$K_{SV} (\text{M}^{-1})$	$K_{SV} (\text{M}^{-1})$
Tampão (t_0)	0,52	1,72	4,50
Glicerol 50% (t_{30})	0,88	5,88	5,81
Manitol 10% (t_{30})	0,75	12,31	8,62

Os parâmetros de K_{SV} e f_a calculados indicam que na presença de glicerol a 50% ou de manitol a 10% a proteína se encontra num estado conformacional mais “aberto” e portanto mais acessível ao *quencher*.

3. ENSAIOS DE LIOFILIZAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE 6xHis-hPAHwt

Com o intuito de estudar a capacidade de resistência da fenilalanina hidroxilase recombinante ao processo de liofilização foram efectuados vários ensaios em três etapas distintas. Numa primeira fase a quantidade e actividade da 6xHis-hPAHwt recombinante foram determinadas após liofilização da proteína na presença de diferentes agentes estabilizantes nomeadamente os açúcares glucose a 5%, trealose a 5% e sacarose a 5% e os polióis, manitol a 10% e glicerol a 50%. Esta primeira aproximação permitiu identificar qual o composto que apresentava maior eficácia na manutenção da estabilidade/funcionalidade da proteína submetida à liofilização. Numa segunda fase, dispondo da informação sobre o comportamento dos vários agentes em estudo foram seleccionados os que apresentaram melhor capacidade de estabilização e a concentração óptima de estabilizante foi investigada. Finalmente, numa terceira fase, procedeu-se a uma análise mais detalhada das características da proteína 6xHis-hPAHwt após liofilização na presença da concentração óptima do agente estabilizante mais eficaz.

3.1. Avaliação do poder protector de vários agentes estabilizantes

A quantidade de proteína 6xHis-hPAHwt recombinante foi determinada antes e após os ensaios de liofilização. Os resultados obtidos (figura 15) permitiram-nos concluir que não ocorreram variações significativas da quantidade de proteína, quando liofilizada na presença dos vários agentes em estudo, uma vez que foram observadas percentagens de recuperação de cerca 100%, mais precisamente de $98,4\% \pm 12,4$, $103\% \pm 9,4$ e $102\% \pm 14,4$ com o glicerol a 50%, a sacarose a 5% e a trealose a 5%, respectivamente. A utilização de manitol a 10% ou de glucose a 5% permitiu recuperar quantidades um pouco mais baixas de 6xHis-hPAHwt nomeadamente de, $84\% \pm 10,3$ e de $80\% \pm 8,2$. No entanto, estes compostos são essenciais para a manutenção da proteína durante o processo de liofilização uma vez que na ausência daqueles agentes a recuperação da proteína é muito baixa ($45\% \pm 6,3$). Nesta situação, durante o processo de liofilização a sublimação da água poderá contribuir para a perda destas moléculas que poderão ser essenciais para a manutenção da conformação da proteína 6xHis-hPAHwt.

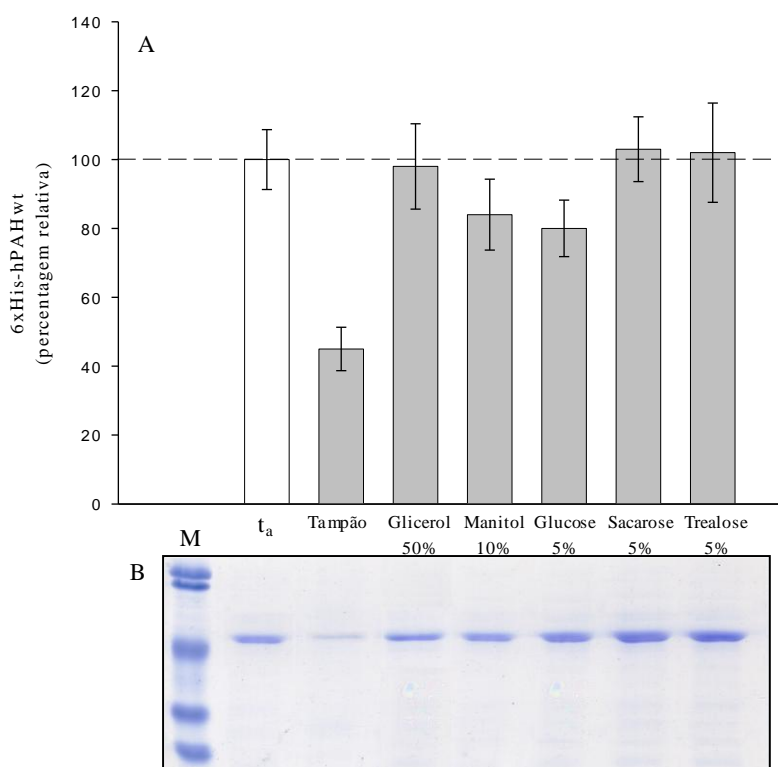


Figura 15 - Avaliação da quantidade (A) e do perfil electroforético (B) da proteína 6xHis-hPAHwt recuperada após liofilização na ausência (tampão) e na presença de diferentes agentes estabilizantes. (t_a) amostra após purificação, antes da liofilização; (M) marcador de massa molecular *Pre-stained Low Range*. A quantidade de proteína 6xHis-hPAH wt no tempo zero de armazenamento foi considerada como 100%. Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

Pela análise do perfil electroforético (SDS-PAGE) da fenilalanina hidroxilase recombinante sujeita à liofilização (figura 15B) foi possível demonstrar que este processo não parece conduzir à proteólise da 6xHis-hPAHwt uma vez que não foram detectados fragmentos proteicos de massa molecular inferior a 55 kDa (produtos de degradação). Mais uma vez a perda de proteína, quando a liofilização é realizada na ausência de adjuvantes, parece ocorrer por formação de agregados insolúveis que são separados da proteína solúvel aquando da centrifugação que é realizada antes da aplicação no gel SDS-PAGE da proteína liofilizada.

As actividades enzimáticas das amostras de 6xHis-hPAHwt antes (t_a) e após liofilização foram também determinadas. Os resultados obtidos, que se encontram ilustrados na figura 16, foram surpreendentes, uma vez que embora os agentes estudados de um modo geral permitissem manter a quantidade de proteína, nem todos foram eficazes na manutenção da capacidade de hidroxilação da L-Phe. Na realidade, a presença quer do glicerol a 50% quer do manitol a 10% contribuiu para uma boa recuperação da 6xHis-hPAHwt (figura 15) mas com uma actividade enzimática baixa, nomeadamente de $4\% \pm 2,4$ e $44\% \pm 4,8$ (figura 16). A sacarose e a trealose a 5% parecem ser os agentes protectores mais eficazes uma vez que permitiram uma recuperação quase total da proteína liofilizada ($\approx 100\%$) com $78\% \pm 3,1$ e $85\% \pm 6,4$ de actividade específica, respectivamente. Os resultados obtidos (figura 15 e 16) indicam claramente, que os açúcares apresentam uma capacidade protectora muito superior aos polióis estudados, que se traduz essencialmente numa maior recuperação da actividade enzimática inicial ($68\% \pm 5,4$ para a glucose a 5%).

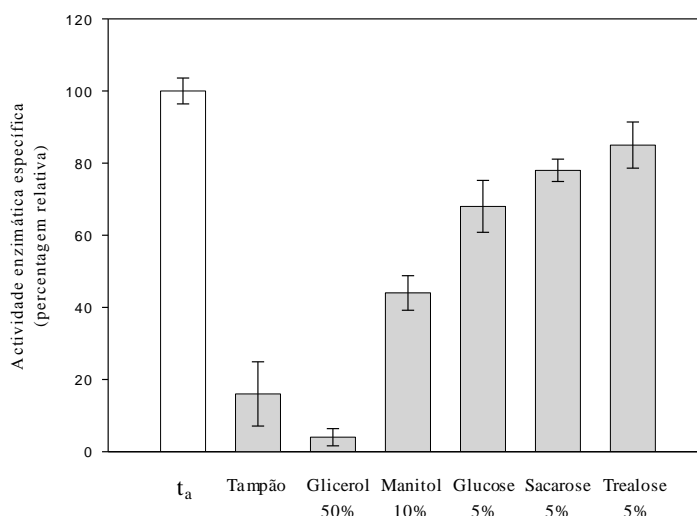


Figura 16 - Percentagem de recuperação da actividade enzimática específica da proteína 6xHis-hPAHwt recombinante, antes (t_a) e após liofilização, na ausência (tampão) e na presença dos vários agentes estabilizantes estudados. (A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 µM 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

A recuperação de apenas 4% \pm 2,4 de actividade da 6xHis-hPAHwt após liofilização na presença de glicerol a 50% não é de estranhar uma vez que, apenas na presença deste agente, o produto obtido após liofilização não tinha uma aparência de pó mas a de um líquido com uma consistência viscosa. Este dado, por si só, poderá indicar que este composto não será o mais adequado como estabilizador da proteína liofilizada.

O perfil de oligomerização das amostras, após liofilização, foi determinado por SEC-HPLC e as percentagens relativas das formas presentes (tabela 5) foram comparadas com os valores obtidos para a proteína 6xHis-hPAHwt antes da liofilização (t_a). Os resultados obtidos permitem concluir que após liofilização a proteína recuperada não apresenta o equilíbrio dímeros \leftrightarrow tetrâmeros característico da proteína em solução uma vez que, de um modo geral, apenas uma das espécies foi identificada. Após liofilização na presença dos açúcares e do manitol a 10% as formas tetraméricas são maioritárias (cerca de 92% com a trealose e 100% com a glucose e sacarose). Na presença de glicerol foram identificadas exclusivamente formas diméricas o que poderá explicar a menor actividade enzimática determinada para esta proteína (44% \pm 4,8; figura 16), uma vez que os dímeros de hPAH apresentam, comparativamente com os tetrâmeros, menor actividade enzimática (Bjorgo E *et al*, 2001).

Tabela 5 - Análise do perfil de oligomerização da proteína 6xHis-hPAHwt, após liofilização, na ausência e presença dos agentes estilizantes glicerol, manitol, sacarose, glucose e trealose.

	Formas oligoméricas (%)				
	Agregados	Hexâmeros	Tetrâmeros	Dímeros	Monómeros
t _a	18	10	56	16	-
Tampão	-	-	69	-	31
Glicerol 10%	-	-	-	100	-
Manitol 10%	-	-	-	-	-
Glucose 5%	-	-	100	-	-
Sacarose 5%	-	-	100	-	-
Trealose 5%	-	-	92	8	-

⁽¹⁾ t_a representa a amostra após purificação, antes da liofilização.

É ainda de referir que após a liofilização, não foram identificadas formas agregadas nem formas hexaméricas/octoméricas. No entanto, na ausência de agentes adjuvantes (tampão) foram detectadas 31% de formas monoméricas (tabela 5). Assim, a liofilização da 6His-hPAHwt e à semelhança do descrito para outras proteínas (Hellman K *et al*, 1983), parece favorecer a dissociação dos tetrâmeros em monómeros

3.2. Optimização da concentração dos estabilizantes mais eficazes

Como referido anteriormente, após identificação dos agentes mais eficazes na manutenção do teor e actividade enzimática da 6xHis-hPAHwt, a concentração óptima desses compostos foi determinada, uma vez que para algumas enzimas, nomeadamente para a fosfofrutoquinase (PFK), estão descritas variações de actividade enzimática em função da quantidade do agente estabilizante utilizado no processo de liofilização (Wang W, 2000). Deste modo, foram estudadas as concentrações de 3, 5 e 7% de glucose, sacarose e trealose. A variação do teor de proteína recuperada após liofilização na presença de concentrações crescentes dos açúcares em estudo encontra-se ilustrada na figura 17. Os resultados obtidos demonstram que, como esperado, os açúcares estudados são eficazes na manutenção da quantidade de proteína recuperada, às diferentes concentrações testadas, com valores de $73\% \pm 10,1$, $78\% \pm 8,7$ e $79\% \pm 5,3$, para as concentrações de 3% de sacarose, trealose e glucose, respectivamente. Quando na concentração de 7% de sacarose, glucose e trealose foi possível recuperar $82\% \pm 13$, $80\% \pm 5,8$ e $79\% \pm 6,8$ de 6xHis-hPAHwt, respectivamente.

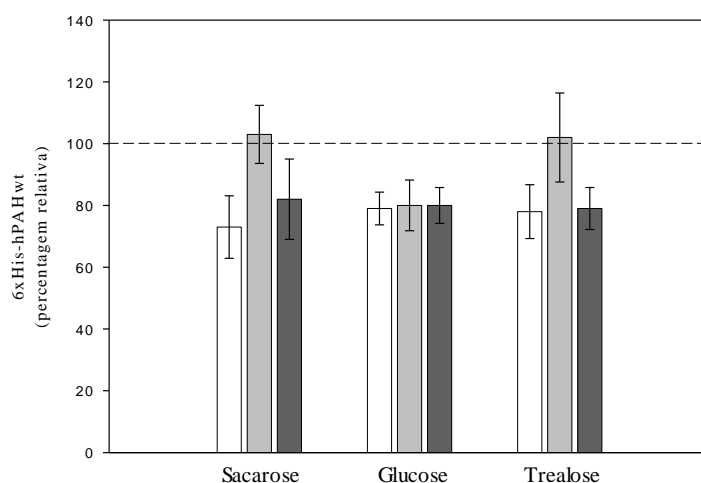


Figura 17 - Percentagem de proteína 6xHis-hPAH recuperada após liofilização na presença de diferentes concentrações de sacarose, glucose e trealose. (□) 3%; (■) 5% e (■) 7%. A quantidade de proteína 6xHis-hPAHwt no tempo zero de armazenamento foi considerada como 100%. Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

A determinação da actividade enzimática das amostras em estudo (figura 18) demonstrou que para a glucose e para a sacarose não parece ser possível estabelecer uma relação directa entre a concentração de estabilizante utilizada e a percentagem de recuperação da actividade da enzima liofilizada.

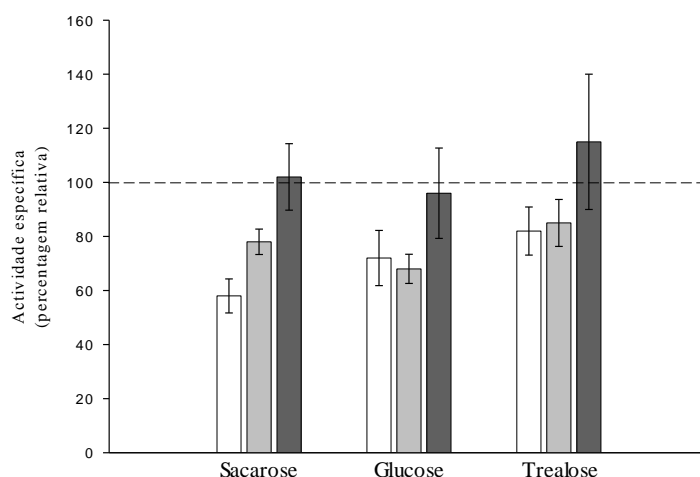


Figura 18 - Percentagem de recuperação da actividade específica da proteína 6xHis-hPAH após liofilização na presença de diferentes concentrações de sacarose, glucose e trealose. (□) 3%; (■) 5% e (■) 7%. (A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μ M 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes).

Os valores de actividade enzimática mais baixos foram apresentados pela proteína liofilizada na presença de sacarose a 3% ($58\% \pm 6,3$) e de glucose a 5% ($68\% \pm 5,4$) e os valores mais elevados para as concentrações de 7% de glucose ($96\% \pm 16,7$), sacarose ($102\% \pm 12,3$) e trealose ($115\% \pm 10,8$). Apenas para a trealose a actividade recuperada aumenta à medida que se aumenta a concentração de açúcar na solução proteica a liofilizar.

3.3. Ensaios de estabilidade ao longo do tempo após liofilização

Uma vez que de entre os açúcares estudados a trealose a 5% foi a que apresentou melhores resultados na relação quantidade/actividade ($100\%/85\%$) de enzima 6xHis-hPAHwt recuperada após liofilização, seleccionou-se este composto na concentração a 5% para realizar um estudo mais exhaustivo da proteína solubilizada. Estes ensaios incluíram a caracterização da proteína ao longo do tempo de armazenamento do liofilizado (durante 7 semanas), a 4°C na presença de um agente exsicante.

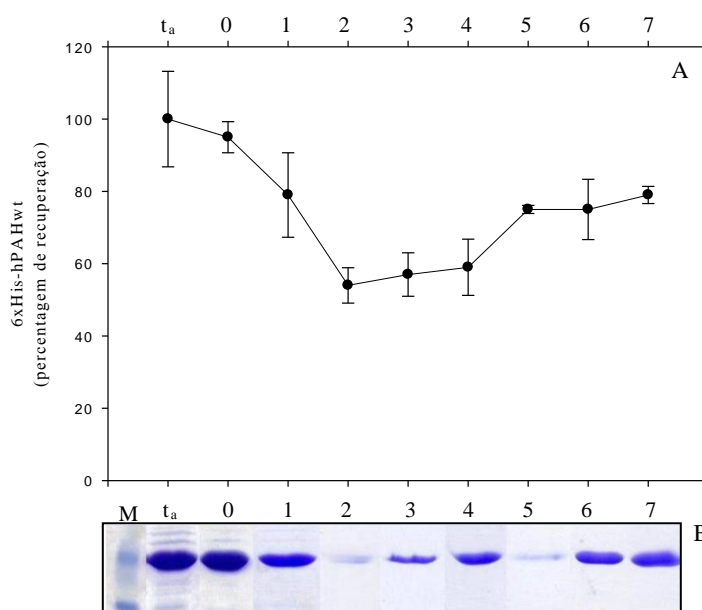


Figura 19 - Quantidade (A) e perfil electroforético (B) da amostra de 6xHis-hPAHwt, liofilizada na presença de trealose a 5%, ao longo do tempo de armazenamento a 4°C . (t_a) amostra antes de liofilização; (0-7) período de armazenamento em semanas; (M) marcador de massas moleculares *Pre-stained Low Range*. A quantidade de proteína 6xHis-hPAH wt no tempo zero de armazenamento foi considerada como 100%. Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

Pela análise da figura 19A é possível concluir que as perdas de proteína ao longo do tempo de armazenamento, após liofilização são pouco significativas. É de realçar que esses valores diminuem até às 4 semanas de armazenamento ($59\% \pm 7,8$), sofrendo depois um incremento até ao período máximo de estudo ($79\% \pm 2,4$).

Mais uma vez a análise do perfil electroforético das amostras em estudo (figura 19B) não revelou a presença de produtos de menor massa molecular (< 55 kDa) o que significa a proteína não está sujeita a degradação proteolítica.

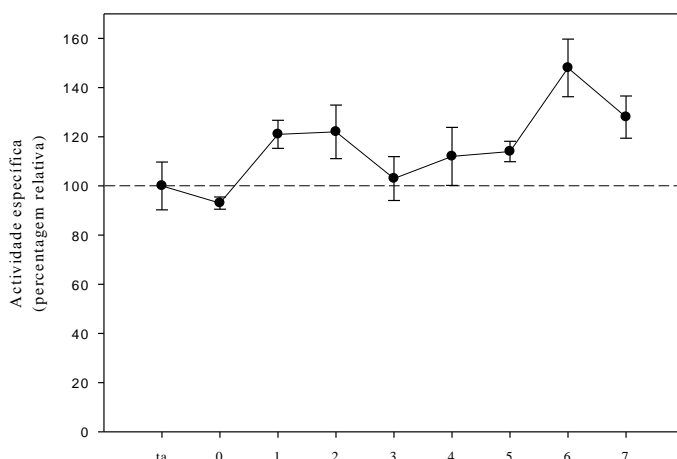


Figura 20 - Actividade específica, em percentagem, da amostra de 6xHis-hPAHwt, liofilizada na presença de trealose a 5%, ao longo do tempo de armazenamento a 4°C. (t_a) amostra antes de liofilização; (0-7) período de armazenamento em semanas. A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μ M 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

Igualmente a actividade enzimática da 6xHis-hPAHwt não sofre alterações significativas durante o período de armazenamento em estudo (figura 20). Embora sujeita a algumas variações, ao fim de 7 semanas de armazenamento foi possível recuperar cerca de $128\% \pm 8,6$ de capacidade hidroxilativa.

O estado de desamidação da proteína 6xHis-hPAHwt recombinante liofilizada foi também avaliado ao longo do tempo de armazenamento. Como referido anteriormente, a desamidação não enzimática de proteínas em solução é um processo que poderá ocorrer quando a proteína se encontra sujeita a variações de pH ou de temperatura, e que poderá conduzir à alteração da sua actividade biológica, uma vez que a desamidação não enzimática ocorre preferencialmente nos resíduos Asn, convertendo-os em resíduos de Asp. De acordo com o seu grau de desamidação, ao sofrer este

processo a proteína apresentará uma micro-heterogeneidade que se traduz pela identificação de várias espécies proteicas, com a mesma massa molecular mas diferentes pI. Assim, quanto maior o grau de desamidação mais baixo será o pI das espécies proteicas.

O pI calculado para a proteína PAH humana é de 5 - 5,2 (Petruschka L *et al*, 1990). De acordo com Solstad (Solstad T *et al*, 2000) a proteína recombinante apresenta 3 formas distintas com pI de $\approx 5,9$ (maioritária), $\approx 5,8$ e $\approx 5,7$. A percentagem relativa destas formas varia em função do tempo de indução. Assim, para períodos muito longos de indução (24h) a percentagem da forma mais básica diminui, aparecendo uma quarta forma com pI de $\approx 5,6$ (Solstad T *et al*, 2003), que será reflexo do “envelhecimento” da proteína.

No caso da proteína recombinante 6xHis-hPAHwt o pI calculado (http://expasy.org/cgi-bin/pi_tool) é de 6,11. Este valor, mais básico resulta da presença da sequência hexahistidil na proteína de fusão. A separação por electroforese bidimensional (2D SDS-PAGE) de uma amostra de 6xHis-hPAHwt e a comparação do perfil obtido com o de uma solução padrão (2-SDS-PAGE *standard*; figura 20A) permitiu confirmar que o pI da proteína recombinante se situa entre 6-6,1. Uma vez que a proteína 6xHis-hPAHwt é obtida após indução de 3h, o perfil electroforético da amostra, após purificação, apresenta a micro-heterogeneidade característica (figura 20B; t_0). Na realidade, foram identificadas quatro formas com pI de $\approx 6,1$, $\approx 5,9$, $\approx 5,8$ e $\approx 5,7$. Tendo em consideração o local preferencial de desamidação demonstrada para a hPAH recombinante (Solstad T *et al*, 2003), as formas detectadas parecem corresponder à proteína sem desamidação (pI calculado de 6,11) e às formas desamidadas na Asn32 (pI calculado de 5,97), Asn376 (pI calculado de 5,90) e Asn133 (pI calculado de 5,83).

Relativamente à amostra liofilizada na presença de 5% de trealose, e armazenada durante 7 semanas à temperatura de 4°C, pela análise da figura 21B é possível concluir que não ocorre desamidação ao longo do seu tempo de armazenamento, uma vez que quer a percentagem relativa das diferentes formas, quer o perfil electroforético se mantêm, não sendo identificadas formas adicionais a pHs mais ácidos.

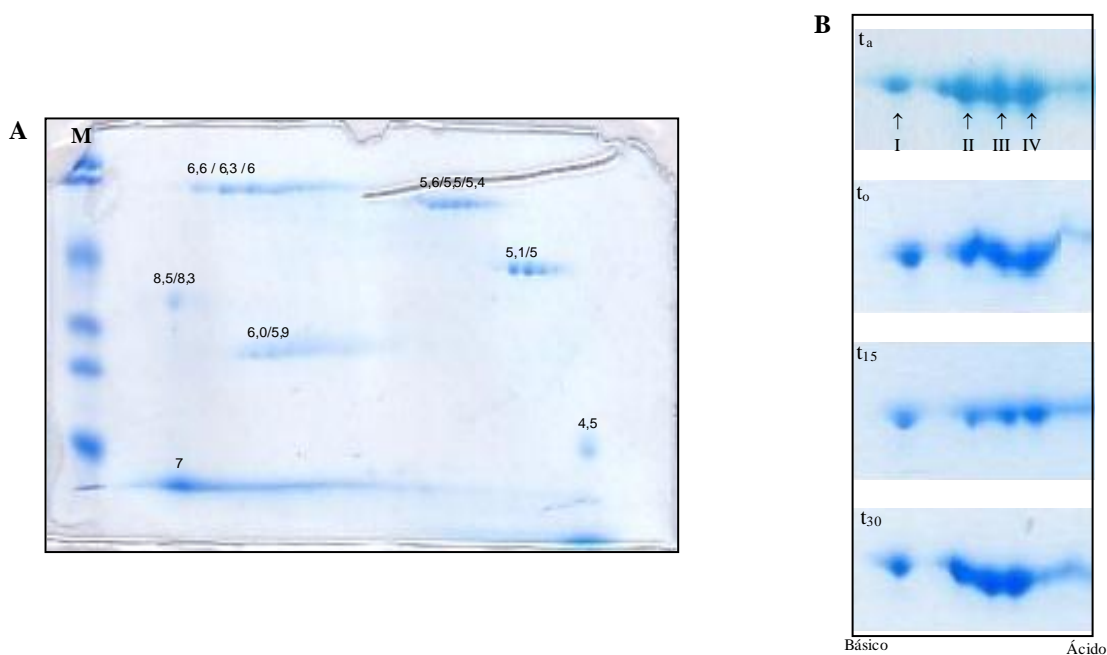


Figura 21 - Análise por electroforese bidimensional (2D SDS-PAGE) da proteína 6xHis hPAHwt recombinante, liofilizada na presença de 5% de trealose, ao longo do tempo de armazenamento a 4°C. (A) perfil electroforético da solução padrão. (B) 6xHis hPAHwt recombinante: (t_a) antes da liofilização; (t₀) após liofilização; (t₁₅) 2 semanas de armazenamento após liofilização e (t₃₀) 4 semanas de armazenamento após liofilização. Os pI de ≈6,1 (I), ≈5,9 (II), ≈5,8 (III) e 5,7 (IV) encontram-se assinalados.

3. Discussão

Tem sido descrito por diversos autores que a fenilalanina hidroxilase humana é uma enzima instável (Gámez A *et al*, 2004). Na realidade, após purificação a manutenção da actividade enzimática da hPAH só é possível se esta for imediatamente congelada a -120°C e não for sujeita a processos repetidos de congelamento/descongelamento. No entanto, até à data, não tinham ainda sido identificados os mecanismos subjacentes à instabilidade observada experimentalmente, nem tinham sido definidas estratégias laboratoriais para manutenção da actividade daquela enzima.

No seu conjunto, os ensaios efectuados sugerem que quando armazenada em solução a hPAH tende a formar agregados insolúveis e solúveis. Deste modo, a instabilidade física parece ser a causa mais provável da redução do teor de proteína solúvel e da diminuição da actividade enzimática específica da hPAH em solução. Sendo assim, torna-se necessário inibir a instabilidade proteica observada durante o armazenamento da 6xHis-hPAH. Com esta finalidade recorreremos à utilização de duas

estratégias experimentais: (1) a utilização de agentes estabilizantes de soluções proteicas e; (2) conservação da proteína na sua forma sólida (proteína liofilizada).

Os ensaios de estabilidade em solução, utilizando diversos agentes estabilizantes, realizados no decurso deste trabalho indicam que em solução, após 30 dias de armazenamento, a -20°C , os aditivos mais eficazes na manutenção da quantidade da proteína 6xHis-hPAHwt foram o manitol a 10%, a sacarose a 5% e a trealose a 5%, uma vez que contribuíram para a recuperação de, respectivamente 90, 97 e 104% de proteína recombinante. Estes compostos permitiram ainda conservar cerca de 70 (manitol a 10%), 100 (sacarose a 5%) e 90% (trealose a 5%) de actividade residual. O glicerol a 50% embora tenha apresentado uma boa percentagem de recuperação da actividade enzimática ($\approx 83\%$) apenas permitiu recuperar cerca de 42% de proteína 6xHis-hPAHwt. De um modo geral, foi também verificado que a presença de qualquer um dos aditivos atrás mencionados, protegia a formação de agregados proteicos solúveis, mesmo após 30 dias de armazenamento. Curiosamente, apenas quando na presença de glicerol a 50% ou de manitol a 10%. O perfil de oligomerização, não só é semelhante ao da forma selvagem, mas também é deslocado no sentido de um enriquecimento da fracção tetramérica após incubação com o substrato L-Phe. Estes resultados parecem indicar que apenas na presença destes compostos a proteína apresentará uma estrutura semelhante à da forma nativa suficientemente “maleável”, para poder responder conformacionalmente à presença de L-Phe no meio. Os ensaios de proteólise limitada e a determinação da acessibilidade dos resíduos de Trp a diferentes *quenchers* apontam para que esse estado conformacional seja resultado de uma estrutura proteica mais aberta. Nestas condições (30 dias de armazenamento, a -20°C , na presença de glicerol a 50% ou de manitol a 10%) a proteína 6xHis-hPAHwt para além de manter a cooperatividade positiva ($h > 1,4$) e a inibição pelo co-factor BH_4 e aumenta a sua eficiência catalítica basicamente devido ao aumento da sua afinidade para o substrato (menor $S_{0,5}$ L-Phe). Embora não se encontre completamente esclarecido o mecanismo de estabilização proteica dos polióis e açúcares em solução, pensa-se que estes contribuam para o aumento da tensão superficial do meio o que conduzirá à hidratação preferencial da proteína.

Relativamente aos ensaios de liofilização efectuados até à data, estes demonstram que é possível liofilizar a proteína 6xHis-hPAHwt sem que se observe alterações apreciáveis quer na quantidade quer na actividade da amostra proteica. No entanto, para que tal aconteça é fundamental a presença de agentes estabilizantes

específicos nomeadamente a trealose a 5%, a sacarose a 5% ou a glucose a 5%. Na presença de manitol a 10% ou de glicerol a 50%, embora tenha sido possível recuperar cerca de 90% de proteína, a actividade enzimática determinada representava, respectivamente apenas cerca de 44 e 4% da actividade inicial.

O processo de liofilização envolve basicamente dois passos, um congelamento rápido da solução (-180°C) e posteriormente uma desidratação da solução congelada. Durante este último passo, o qual ocorre sob vácuo, há remoção da água solidificada e da água não congelada que se encontra “associada” às proteínas. Uma vez em solução, no seu estado nativo, a superfície proteica encontra-se coberta por uma monocamada de água, designada por camada de hidratação (Rupley JA e Careri G, 1991). A desidratação que ocorre durante a liofilização irá remover algumas moléculas de água da camada de hidratação sendo portanto um dos factores de *stress* proteico que ocorre durante aquele processo, podendo mesmo induzir alterações conformacionais na estrutura proteica final.

Deste modo, e à semelhança do descrito para outras proteínas (Hellman K *et al*, 1983), a fraca recuperação quer do teor quer da actividade da proteína 6xHis-hPAHwt, após liofilização na ausência de adjuvantes, poderá ter como causa uma alteração da camada de hidratação que ocorre durante a fase de desidratação, o que de algum foi prevenido com a utilização de agentes estabilizantes. Estes compostos têm a capacidade de proteger a proteína de desnaturar quer durante o processo de congelamento quer durante o processo de desidratação. Embora não seja ainda conhecido com exactidão qual o mecanismo de estabilização proteica pensa-se que no processo de liofilização a sua acção seja fundamentalmente diferente do mecanismo de estabilização em solução (Kaushik JK e Bhat R, 2003). Assim, os adjuvantes de liofilização deverão apresentar a capacidade de formar não estruturas cristalinas mas massas amorfas com uma elevada viscosidade que irão diminuir quer a interconversão de sub-estados conformacionais, quer o relaxamento da estrutura proteica (Hagen SJ *et al*, 1995 e 1996). Outro mecanismo proposto envolve o fenómeno de substituição das moléculas de água. De acordo com este modelo, ocorre formação de ligações de H entre a proteína e o agente estabilizante de modo a satisfazer as necessidades dos grupos polares da superfície proteica. Estes agentes funcionarão assim como substituintes da água formando ligações de H com a proteína.

De acordo com este último modelo a cristalização dos agentes estabilizantes durante o processo de liofilização poderá induzir uma instabilidade proteica uma vez

que nesta situação estes compostos não poderão formar ligações de H com a proteína. Este facto poderá explicar a razão pela qual de entre os agentes testados o manitol e o glicerol apresentaram menor capacidade protectora. Em particular o manitol, por cristalizar facilmente apresentará uma menor capacidade de formação de ligações de hidrogénio com a proteína, levando a uma menor estabilização desta e consequente perda de actividade. Pelo contrário, os açúcares por formarem estruturas amorfas quando submetidos ao processo de liofilização, poderão estabilizar a 6xHis-hPAHwt uma vez que permitirão a formação de ligações de H com os resíduos polares da superfície proteica. A menor capacidade protectora do monossacárido estudado (glucose) e a maior capacidade dos dissacáridos (sacarose e trealose) poderá estar relacionada com o número de grupos OH presentes nestes compostos condicionando, mais uma vez, a formação de ligações de H com a proteína.

Para além de protegerem a 6xHis-hPAHwt dos factores de *stress* a que esta se encontrou sujeita durante a liofilização, a trealose a 5% minimizou os riscos de instabilidade que frequentemente ocorrem durante o processo de conservação do liofilizado nomeadamente a formação de agregados ou a desamidação não enzimática. Adicionalmente este aditivo parece estabilizar a proteína na sua forma tetramérica mais activa.

No seu conjunto, os resultados obtidos permitiram-nos concluir que é possível preservar a quantidade e actividade da enzima pura durante o processo de armazenamento. No entanto, para que este resultado seja atingido é necessário manter a proteína, a -20°C, numa solução contendo aditivos ou recorrer ao processo de liofilização, o qual terá que ser efectuado na presença de sacarose, trealose ou glucose.

Capítulo II

*Estabilização In Vivo de Formas Mutantes
da Fenilalanina Hidroxilase Humana:
Acção de Chaperones Químicos*

1. INTRODUÇÃO

Presentemente é reconhecida a existência de um grupo de compostos de pequena massa molecular que apresentam a capacidade de, *in vitro* e *in vivo*, estabilizar proteínas conformacionalmente alteradas. Estes compostos, designados por chaperones químicos, actuam sobre a proteína não nativa prevenindo a sua agregação e/ou desnaturação e consequente perda da actividade funcional. São considerados membros desta classe de moléculas os osmólitos naturais glicerol, taurina e N-óxido de trimetilamina (TMAO), bem como o ácido 4-fenilbutírico (4-PBA), um ácido gordo frequentemente utilizado na terapia das anomalias do ciclo da ureia (Burlina AB *et al*, 2001).

Os osmólitos naturais são compostos que alguns organismos têm a capacidade de se acumularem em situações de *stress* celular. À semelhança dos chaperones moleculares, estas moléculas não fazem parte, nem devem fornecer qualquer informação para a estrutura proteica final. O seu mecanismo estabilizador deverá ter como base um efeito osmofóbico (forças termodinâmicas solvofóbicas) uma vez que é a sua exclusão da superfície proteica que conduzirá ao aumento do estado de hidratação da proteína e consequentemente à indução do *folding* proteico (Bolen DW e Baskakov IV, 2001). Enquanto que a taurina e o glicerol são considerados osmólitos compatíveis (podem-se acumular intracelularmente sem alterar as funções das proteínas celulares), o TMAO (presente em celacantos e elasmobrânquios marinhos; Song JL e Chuang DT, 2001) é considerado um osmólito neutralizante uma vez que é produzido pela célula para reverter o efeito desnaturante da acumulação intracelular de ureia (Wang A e Bolen DW, 1997). *In vitro* foi já demonstrado que o TMAO tem a capacidade de forçar a aquisição da correcta conformação de proteínas que não o façam naturalmente (Yang DS *et al*, 1999; Song JL e Chuang DT, 2001).

Recentemente, ao 4-PBA foi também atribuído um efeito protector semelhante ao dos osmólitos naturais (Perlmutter DH, 2002), tendo a capacidade de actuar como potencial estabilizador de proteínas, que devido ao seu estado conformacional alterado, são responsáveis por estados patológicos (Perlmutter DH, 2002; Rubenstein RC, *et al*, 1997 e 1998; Singh OV *et al*, 2006). O seu efeito foi referido por Rubenstein e colaboradores, na fibrose quística, na correcção do endereçamento da proteína mutante CFTR Δ F508 (delecção do resíduo de Phe na posição 508 da proteína CFTR - *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) para a superfície celular (Rubenstein

RC *et al*, 1977; Wynn RM *et al*, 2000) e na modulação da secreção da proteína mutada α 1-ATZ (α 1-antitripsina; α 1-AT) num modelo celular da deficiência em α 1-AT (Burrows JA *et al*, 2000).

Como referido anteriormente, a PKU é presentemente classificada como uma doença conformacional uma vez a maior parte das proteínas hPAH mutantes apresenta alterações profundas na sua conformação tridimensional que conduzem rapidamente à sua degradação e/ou agregação. A população PKU portuguesa apresenta um espectro mutacional característico, sendo as alterações do gene *PAH* mais frequentes a c.194T→C (p.I65T), a c.782G→A (p.R261Q), a c.8096G→A (p.R270K) e a c.1162G→A (p.V388M) (Rivera I *et al*, 2000; Vilarinho L *in press*). As proteínas PAH R261Q, V388M e I65T encontram-se associadas a um fenótipo de PKU moderada e representam 16,3, 9,7 e 9,7%, respectivamente, das mutações identificadas na população PKU portuguesa. A forma R270K, identificada em doentes portadores de um fenótipo de PKU clássica representa cerca de 8,2% das proteínas mutantes da nossa população PKU. Enquanto a incidência das proteínas mutantes V388M e R270K é elevada apenas em Portugal, Espanha e Brasil, as formas mutantes I65T e R261Q representam as terceiras e as quartas mutações mais frequentes a nível mundial, respectivamente. Quando obtidas em sistemas de expressão heteróloga as proteínas mutantes V388M, R261Q e I65T apresentaram actividade residuais de 20-30% (Leandro P *et al*, 2000), enquanto a forma R270K mantém apenas cerca de 2% de actividade residual (Leandro P *et al*, 2001b). Adicionalmente, ensaios preliminares revelaram que estas proteínas mutantes representam formas conformacionalmente alteradas (Leandro P *et al*, 2001a) e como tal possíveis de serem moduladas pela acção de chaperones químicos.

Assim, pretendemos investigar o possível efeito estabilizador daqueles compostos sobre as proteínas PAH mutantes, estruturalmente afectadas, mais frequentes na população PKU portuguesa, nomeadamente a I65T, R261Q, V388M e R270K. Os chaperones químicos seleccionados para este estudo foram o glicerol, o TMAO, a taurina e o 4-PBA. Numa primeira fase foram definidas as concentrações óptimas de actuação. Numa segunda etapa, utilizando as condições de estabilização definidas anteriormente, foi efectuado um estudo comparativo entre as características funcionais e estruturais das proteínas mutantes I65T, R261Q, R270K e V388M produzidas na ausência e na presença daqueles compostos.

2. IDENTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES ÓPTIMAS DE CHAPERONES QUÍMICOS

2.1. Efeito sobre o teor e actividade das proteínas expressas

Para avaliar o efeito estabilizador dos chaperones químicos sobre as proteínas PAH mutantes recém-sintetizadas, estes foram adicionados ao meio de cultura em concentrações crescentes, apenas no momento da indução da expressão das proteínas recombinantes (Parte II, parágrafo 3.2). A quantidade e actividade das proteínas produzidas foram sempre comparadas com os valores obtidos para as formas mutantes produzidas na ausência dos chaperones químicos em estudo.

A variação do teor de glicerol no meio de cultura, permitiu verificar que o maior aumento na actividade das enzimas mutantes, à excepção da R270K, foi conseguido com concentrações de 1% de glicerol (figura 1). Com este teor de chaperone químico no meio de cultura as actividades residuais apresentadas pelas enzimas mutantes I65T, V388M e R261Q foram de $47\% \pm 3,9$; $77\% \pm 8,9$ e $75\% \pm 6,2$, respectivamente. A mutação R270K apresenta um máximo de actividade ($17\% \pm 6,2$) com uma concentração de glicerol de 5%.

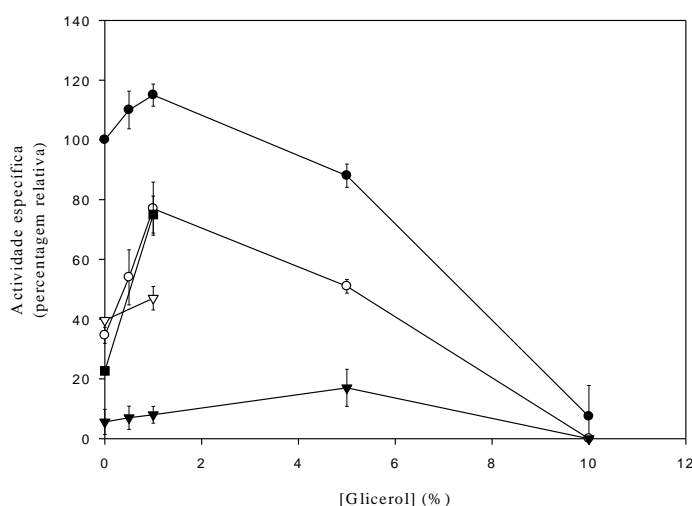


Figura 1 - Efeito da variação da concentração de glicerol na actividade específica da 6xHis-hPAHwt (●) e formas mutantes I65T (▽), R261Q (■), R270K (▼) e V388M (○). (A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μ M 6-MPH4). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

Embora o efeito do glicerol seja também observado para a forma selvagem (aumento de 1,4 vezes com 1% de glicerol), a variação da actividade enzimática é mais

significativa para as formas mutantes. Numa concentração de 10% o glicerol tem um efeito inibidor da actividade quer das formas mutantes, quer da forma selvagem da 6xHis-hPAHwt.

As proteínas 6xHis-hPAH wt e mutantes foram produzidas na presença de concentrações de taurina de 2,5; 5 e 10 mM. A determinação da actividade enzimática destas amostras (figura 2) permite concluir que este chaperone exerce efeitos diferentes sobre as proteínas mutantes em estudo. Na realidade, na gama testada a actividade residual da R270K não sofreu alterações e para a I65T apenas foi possível atingir cerca de 41% (10 mM taurina). Os aumentos de actividade residual foram mais notórios para a R261Q e para a V388M onde foi possível atingir, com 10 mM de taurina, cerca de 57% e 90%, respectivamente. É ainda de referir que esta concentração de chaperone químico induz um aumento na actividade residual da forma selvagem de cerca de 1,2 vezes. Estes resultados parecem indicar que o mecanismo de acção da taurina será mais específico da proteína mutante em causa.

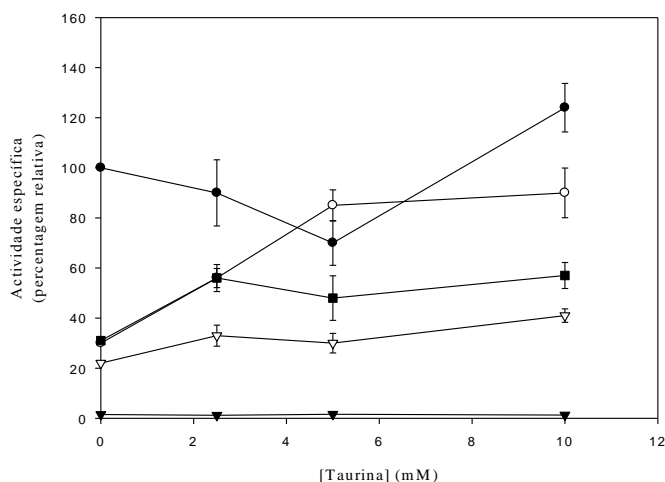


Figura 2 – Efeito da variação da concentração de taurina na actividade específica da 6xHis-hPAHwt (●) e formas mutantes I65T (▽), R261Q (■), R270K (▼) e V388M (○). (A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μ M 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes).

Na presença do chaperone TMAO (figura 3) verifica-se que as proteínas mutantes V388M e R270K não apresentam um aumento muito acentuado na actividade residual, com valores de 62% \pm 1,8 e 12% \pm 2,8 respectivamente. Nesta concentração, o TMAO exerce efeitos semelhantes sobre as formas I65T e R261Q com aumento de

atividades para $75\% \pm 12,3$ e $71\% \pm 9,9$, respectivamente. Curiosamente, concentrações elevadas de TMAO (50 mM) parecem inibir a actividade enzimática das formas mutantes. Sobre a proteína selvagem, este efeito apenas foi observado para concentrações de TMAO de cerca de 100 a 500 mM (resultados não mostrados).

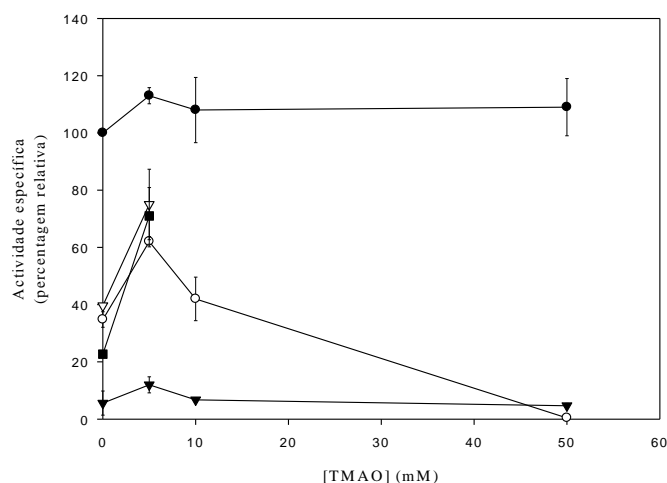


Figura 3 - Efeito da variação da concentração de TMAO na actividade específica da 6xHis-hPAHwt (●) e formas mutantes I65T (▽), R261Q (■), R270K (▼) e V388M (○). (A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%). Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μ M 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

O 4-PBA foi também testado como possível chaperone químico das formas mutantes da fenilalanina hidroxilase recombinante uma vez que se encontra descrito como estabilizante de proteínas responsáveis por doenças genéticas como a fibrose quística. Os resultados obtidos (figura 4) demonstram, no entanto, que para as proteínas 6xHis-hPAH não foi possível obter um efeito estabilizante. Pelo contrário, verifica-se que, à medida que se aumenta a concentração de 4-PBA no meio de cultura a actividade da proteína selvagem e das formas mutantes diminui, neste últimos casos para valores próximos do zero.

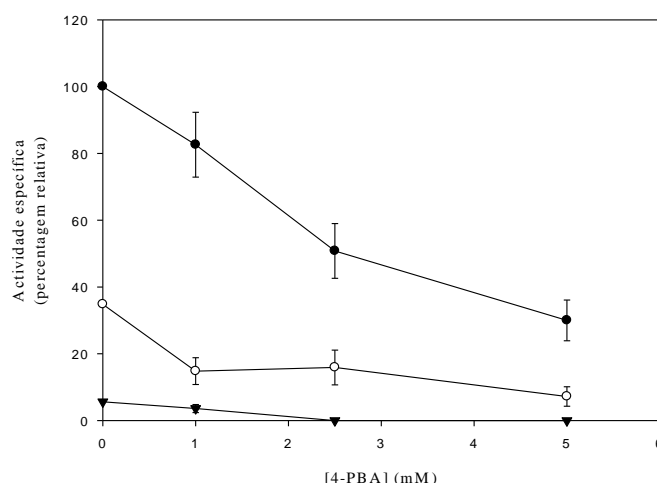


Figura 4 - Efeito da variação da concentração de 4-PBA na actividade específica da 6xHis-hPAHwt (●) e formas mutantes R270K (▼) e V388M (○). (A actividade específica da 6xHis-hPAH wt no tempo zero foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μ M 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

O aumento da actividade enzimática, calculado em função do valor apresentado pela enzima mutante quando produzida na ausência de chaperones químicos, é apresentado na figura 5. De acordo com os resultados obtidos, o glicerol a 1% e o TMAO a 5mM, parecem exercer um efeito sobre todas as proteínas mutantes. Pelo contrário, a taurina parece exercer um efeito mais específico da proteína mutante em causa uma vez que apenas foi observado um incremento na actividade das proteínas mutantes V388M (2,6 vezes) e R261Q (2,5 vezes). A proteína mutante R270K foi a que apresentou o maior incremento na sua actividade enzimática com um aumento de 10,6 e 7,5 vezes quando produzida na presença de glicerol a 5% e TMAO a 5 mM, respectivamente. No entanto, como esta enzima possui um valor muito baixo de actividade residual (2%) o aumento observado apenas permite atingir cerca de 20% de actividade específica.

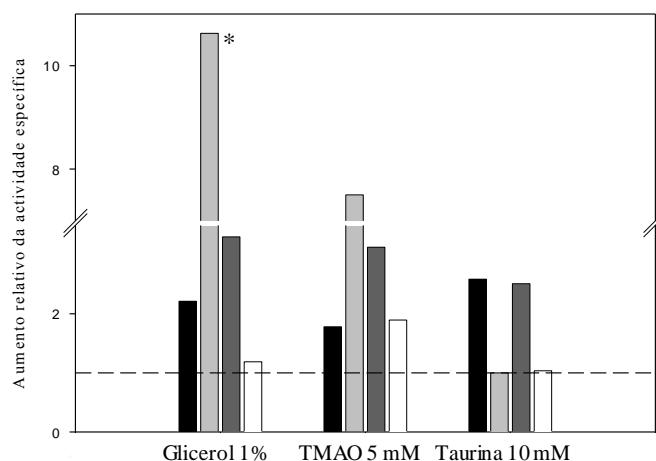


Figura 5 – Aumento na actividade enzimática obtido para as proteínas mutantes V388M (■), R270K (□), R261Q (■) e I65T (□) quando produzidas na presença dos chaperones químicos glicerol a 1%, TMAO a 5mM e taurina a 10 mM. O aumento foi calculado em função da actividade enzimática determinada para as proteínas mutantes produzidas na ausência de chaperones químicos (valor de 1). *Incremento observado com 5% glicerol no meio de cultura.

Tendo em conta os resultados experimentais o glicerol a 1% e o TMAO 5mM foram os agentes seleccionados para realizar um estudo mais detalhado das características bioquímicas e estruturais das proteínas produzidas. O 4-PBA foi eliminado uma vez que na gama de concentrações testadas (0-5 mM) não foi possível obter qualquer incremento na actividade residual das formas mutantes em estudo.

3. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES PRODUZIDAS NA PRESENÇA DAS CONCENTRAÇÕES ÓPTIMAS DOS CHAPERONES QUÍMICOS MAIS EFICAZES

3.1. Rendimento proteico

A quantidade de proteína 6xHis-hPAH expressa na ausência e na presença dos chaperones químicos glicerol (1%) e TMAO (5 mM) foi monitorizada por análise de Western Blotting da fracção proteica solúvel e insolúvel (figura 6) e pela determinação do rendimento proteico obtido, após purificação (figura 7).

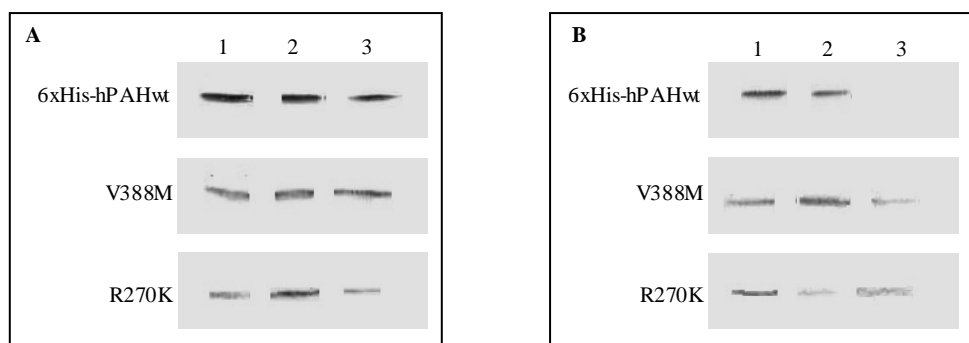


Figura 6 – Análise por Western-blotting da fracção solúvel (A) e da fracção insolúvel (B) do extracto bruto celular após indução da proteínas 6xHis-hPAHwt e formas mutantes V388M e R270K na ausência (1) e na presença de 1% de glicerol (2) e 5 mM de TMAO (3).

Na figura 6 é apresentado, a título exemplificativo, a imunodeteção das proteínas recombinantes 6xHis-hPAHwt, V388M e R270K, na fracção solúvel e fracção insolúvel do extracto celular bruto. Como se pode observar, na concentração utilizada a presença dos chaperones químicos glicerol e TMAO não altera significativamente o nível de expressão das proteínas recombinantes. Apenas a forma mutante R270K apresentou um ligeiro aumento do teor proteico da fracção solúvel e uma diminuição da respectiva fracção insolúvel, quando produzida na presença de glicerol. A adição de TMAO ao meio de cultura resultou numa diminuição da proteína na fracção insolúvel.

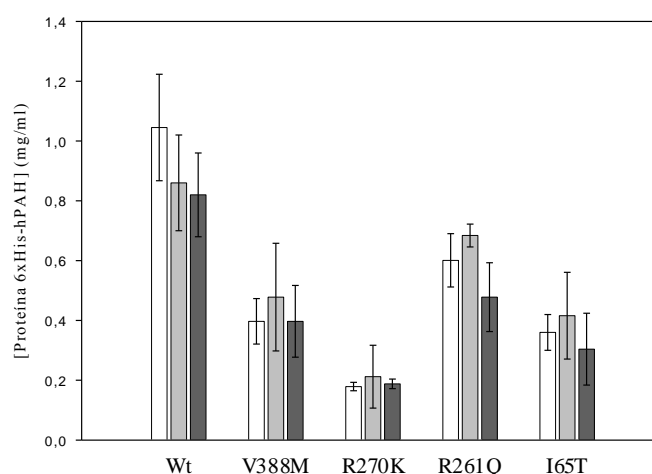


Figura 7 – Quantidade de proteína 6xHis-hPAH selvagem (Wt) e formas mutantes V388M, R270K, R261Q e I65T produzidas na ausência (□) e na presença de 1% de glicerol (■) e 5 mM de TMAO (■).

Adicionalmente, a presença dos chaperones químicos glicerol e TMAO também não parece introduzir alterações significativas na quantidade de proteína produzida. Estes resultados indicam que o efeito é exercido directamente sobre a conformação da proteína recém-sintetizada e não na modulação dos níveis de expressão proteica.

3.2. Perfil de oligomerização

O perfil de oligomerização das proteínas mutantes produzidas na ausência e na presença dos agentes químicos previamente seleccionados foi determinado por SEC-HPLC. Uma vez que a presença do equilíbrio tetrâmero \leftrightarrow dímero (Parte III, capítulo I, tabela 1) constitui uma característica fundamental das proteínas hPAH, foi efectuada a análise cromatográfica das amostras em estudo sem e com incubação com o substrato L-Phe. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 1 e na figura 8. Foi assim possível constatar que as proteínas I65T, R261Q, V388M e R270K apresentam uma elevada percentagem de formas agregadas, pelo que na realidade estas formas mutantes deverão representar proteínas conformacionalmente alteradas.

À excepção da proteína I65T (figura 8A), a presença de glicerol no meio de cultura minimizou a formação de estruturas agregadas nas formas R261Q, V388M e R270K (figura 8B, C e D). No entanto, é de salientar que apesar de induzir um aumento de formas tetraméricas nas proteínas R270K e V388M, o equilíbrio tetrâmero \leftrightarrow dímero não é deslocado após incubação com a L-Phe (tabela 1). Estes resultados indicam que, para estas formas mutantes, o glicerol poderá actuar de algum modo sobre o *folding* proteico, induzindo alterações estruturais que irão dominiar a formação de agregados, mas que impedem simultaneamente a proteína de formar tetrâmeros.

O chaperone TMAO apresenta também um efeito bastante acentuado na diminuição das formas agregadas das proteínas mutante, que neste caso pode ser observado em todas as enzimas mutantes. Este composto não parece ser tão eficaz na estabilização das formas tetraméricas, uma vez que para as mutações I65T e R261Q são as formas diméricas as prevalentes após síntese na presença de TMAO (figura 8A e B). O aumento de actividade destas proteínas mutantes na presença de TMAO poderá ser devida à estabilização destas formas diméricas, as quais apresentam também actividade catalítica.

Tabela 1 - Percentagem relativa das formas oligoméricas identificadas por HPLC-SEC das diferentes proteínas 6xHis- hPAH mutantes em estudo, produzidas na ausência e na presença de diferentes chaperones químicos (glicerol, TMAO e taurina) com e sem pré-ativação pelo substrato L-Phe

	Activação (L-Phe)	wt			I65T			R261Q			R270K			V388M		
		Agr.	Tetr.	Dim.	Agr.	Tetr.	Dim.	Agr.	Tetr.	Dim.	Agr.	Tetr.	Dim.	Agr.	Tetr.	Dim.
-	-	18	56	16	68	12	20	48	39	13	65	30	6	63	20	15
	+	16	75	5	70	9	21	58	26	16	55	38	7	60	26	12
Glicerol 1%	-	n.d.	n.d.	n.d.	65	10	25	23	77	0	4	95	0	22	64	14
	+	n.d.	n.d.	n.d.	62	20	18	5	93	2	15	85	0	20	68	12
TMAO 5 mM	-	n.d.	n.d.	n.d.	29	20	51	0	0	100	46	48	6	41	41	18
	+	n.d.	n.d.	n.d.	15	38	47	4	1	95	55	36	8	32	42	25

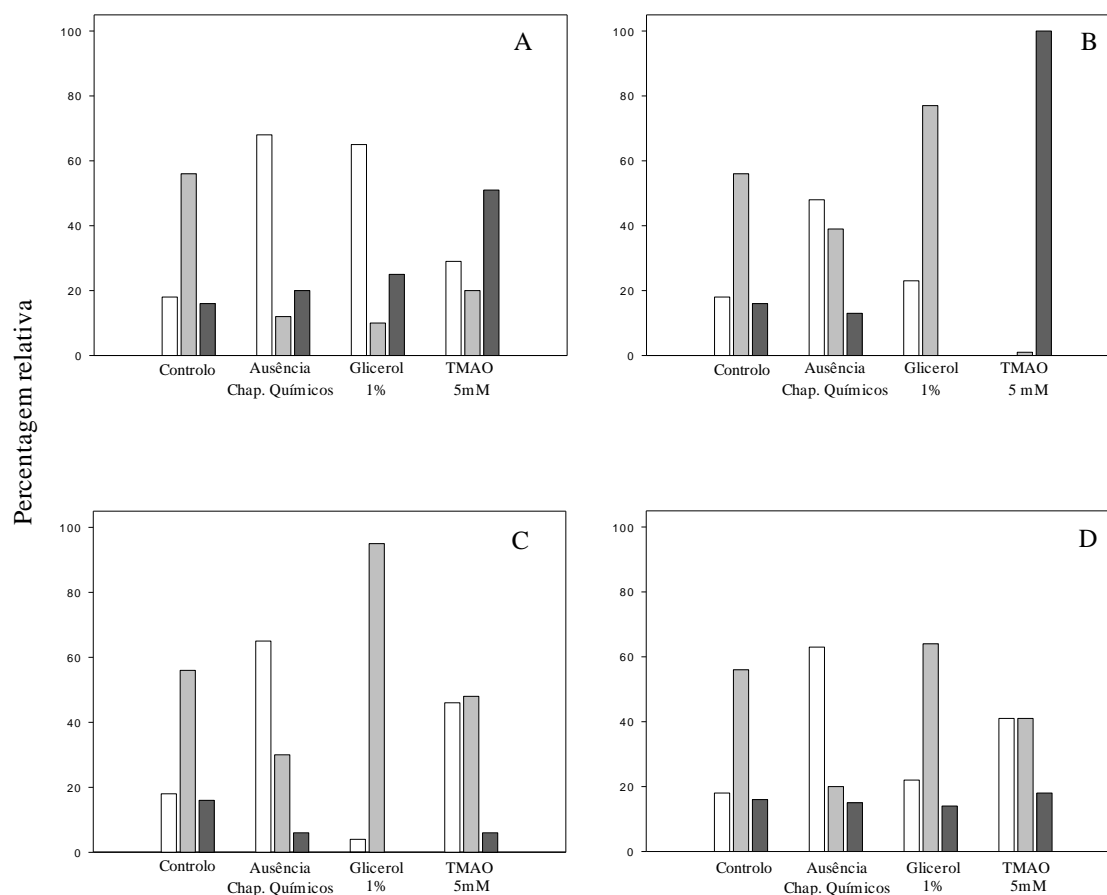


Figura 8 – Perfil de oligomerização apresentado pelas formas mutantes I65T (A), R261Q (B), R270K (C) e V388M (D) quando produzidas na ausência ou presença dos chaperones químicos glicerol e TMAO. (□) formas agregadas; (■) formas tetraméricas; (■) formas diméricas. Como controlo foi utilizada a 6xHis-hPAHwt produzida na ausência de chaperones químicos.

No entanto, e à semelhança do que acontece para as proteínas sintetizadas na presença de glicerol, o substrato L-Phe não induz um aumento das formas tetraméricas.

3.3. Espectros de fluorescência

O espectro de emissão de fluorescência das proteínas mutantes 6xHis-hPAH foram avaliados (figura 9) uma vez que, como referido anteriormente (Capítulo I) estes poderão fornecer informações importantes acerca do estado conformacional destas proteínas.

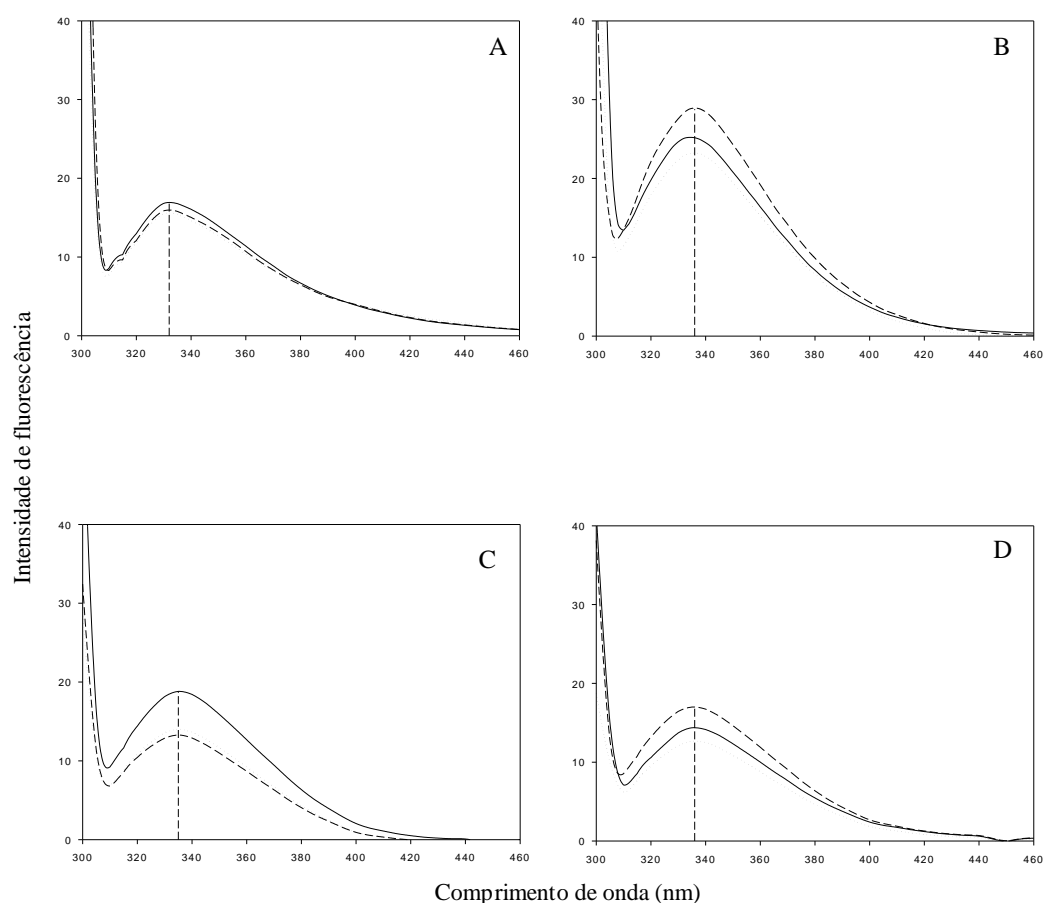


Figura 9 - Espectro de emissão de fluorescência das formas mutantes I65T (A), R261Q (B), R270K (C) e V388M (D) produzidas na ausência de chaperones (—) ou na presença dos chaperones químicos glicerol 1% (···) e TMAO 5mM (---). Os comprimento de onda de 335 nm encontra-se assinalado. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 295 nm.

Os resultados obtidos (figura 9) permitiram verificar que as proteínas I65T, V388M e R270K, produzidas na presença dos chaperones glicerol (1%) ou TMAO (5 mM) mantêm o seu pico máximo de emissão de fluorescência a 335 nm (λ_{exc} 295 nm).

Quando incubadas com o substrato L-Phe, apenas a proteína R261Q (sintetizada na presença de glicerol) sofreu um ligeiro desvio no seu máximo de emissão que se deslocou dos 335 nm para os 338 nm. As restantes proteínas mutantes na presença de L-Phe, não sofrem alteração no comprimento de onda máximo de emissão (resultados não mostrados). Estes resultados, que estão em concordância com os observados para o perfil de oligomerização, na presença do substrato indicam que a presença deste não deverá alterar significativamente a estrutura destas proteínas, o que poderá contribuir para que a taxa de activação pelo substrato seja baixa.

Estes dados poderão indicar que o mecanismo estabilizador não interfere, pelo menos em elevado grau, na estrutura global da proteína. A proteína R261Q parece ser a única que apresenta alguma alteração, ainda que pequena, no seu espectro de fluorescência, o que poderá indiciar uma maior sensibilidade à presença do substrato.

3.4. Perfis de estabilidade térmica

A análise do perfil de estabilidade térmica de uma proteína permite determinar o seu T_m (a temperatura à qual se obtém 50% de actividade residual), um parâmetro importante na avaliação da estabilidade proteica.

Assim, foi determinado o T_m das proteínas mutantes produzidas na ausência e na presença dos chaperones químicos glicerol (1%) e TMAO (5mM). Estes ensaios não puderam ser efectuados para a proteína mutante R270K, uma vez que os valores extremamente baixos de actividade residual não permitiam uma avaliação rigorosa dos dados. Pela análise da figura 10 podemos verificar que o T_m das proteínas mutantes I65T (43°C) e V388M (43°C), produzidas na ausência de chaperones químicos, é significativamente inferior ao valor do T_m da 6xHis-hPAHwt (52°C). Pelo contrário a R261Q apresenta um T_m apenas ligeiramente inferior (49°C) ao da proteína selvagem.

Relativamente ao T_m das proteínas mutantes produzidas na presença dos chaperones químicos podemos constatar, que estes não apresentam um efeito semelhante para todas as proteínas mutantes em estudo. A forma I65T parece ser sensível à presença de glicerol e TMAO passando de um T_m de 43°C para 47 e 49°C, respectivamente (figura 10A). A proteína R261Q não apresenta alterações significativas do T_m (49°C) quando produzida na presença de chaperones (figura 10B), uma vez que os valores obtidos são de 50°C (TMAO) e 47°C (glicerol). A proteína V388M parece ser a mais sensível à presença de glicerol no meio de cultura uma vez que o seu T_m passa de 43°C para 49°C (figura 10C) aproximando-se do valor de T_m da proteína selvagem (53°C). Pelo contrário, para esta forma mutante o TMAO não parece ter a capacidade de exercer um efeito estabilizante uma vez que o T_m obtido foi de apenas 45°C. É ainda de salientar que a presença de glicerol aquando da síntese da forma V388M, permite que esta se torne mais resistente à inactivação por temperaturas elevadas, uma vez que a 60°C a proteína manteve uma actividade residual de cerca de 39%, valor muito superior ao da forma selvagem (9% de actividade residual a 60°C).

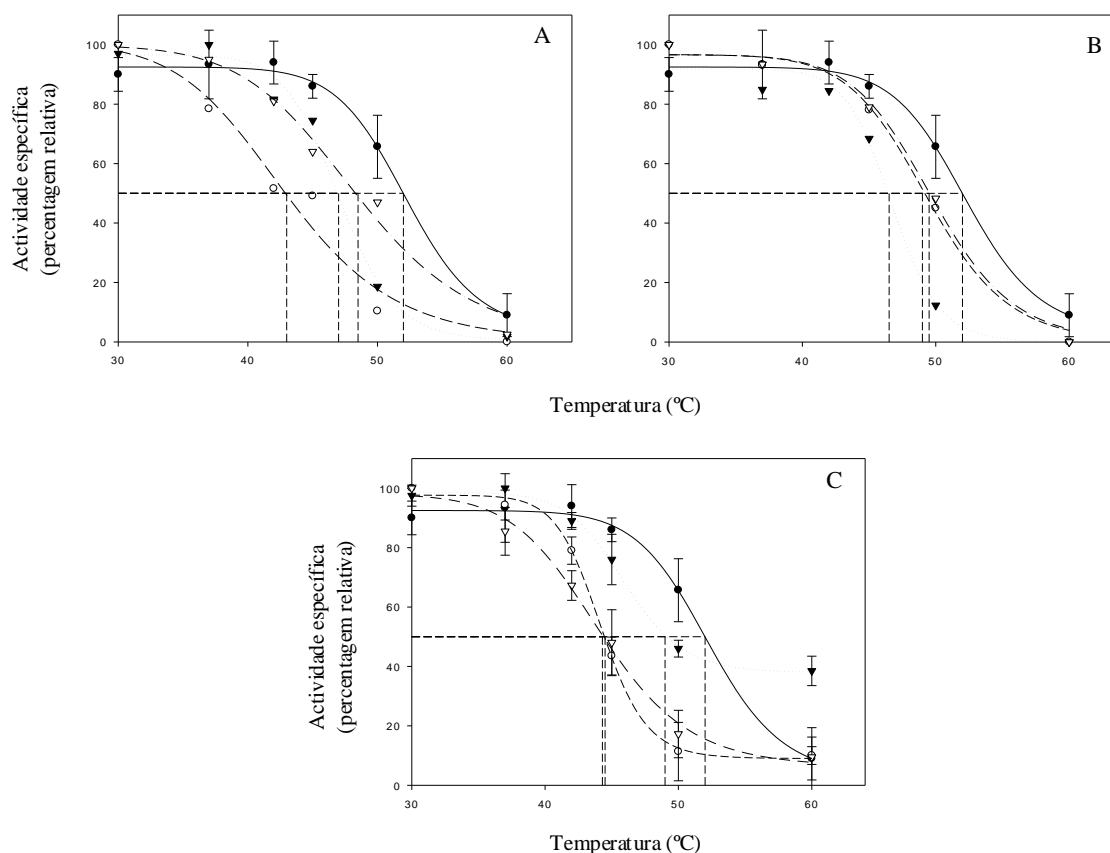


Figura 10 - Perfil de estabilidade térmica das das formas mutantes I65T (A), R261Q (B) e V388M (C) produzidas na ausência de chaperones (○; - -) ou na presença dos chaperones químicos glicerol 1% (▼;) e TMAO (▽; - · -) 5mM. (●; —) proteína 6xHis-hPAHwt.

Deste modo, e de um modo geral, podemos concluir que os chaperones químicos glicerol e TMAO parecem afectar a estrutura de algumas proteínas mutantes, nomeadamente a I65T e a V388M, tornando-as mais resistentes à desnaturação provocada pelo aumento da temperatura.

3.5. Perfil de inactivação enzimática

A determinação do tempo de semi-vida de inactivação ($t_{i1/2}$) pode contribuir para o esclarecimento das características da estrutura proteica. Assim, este parâmetro foi determinado para as proteínas mutantes em estudo através da análise do gráfico semi-logarítmico dos dados apresentados na figura 11.

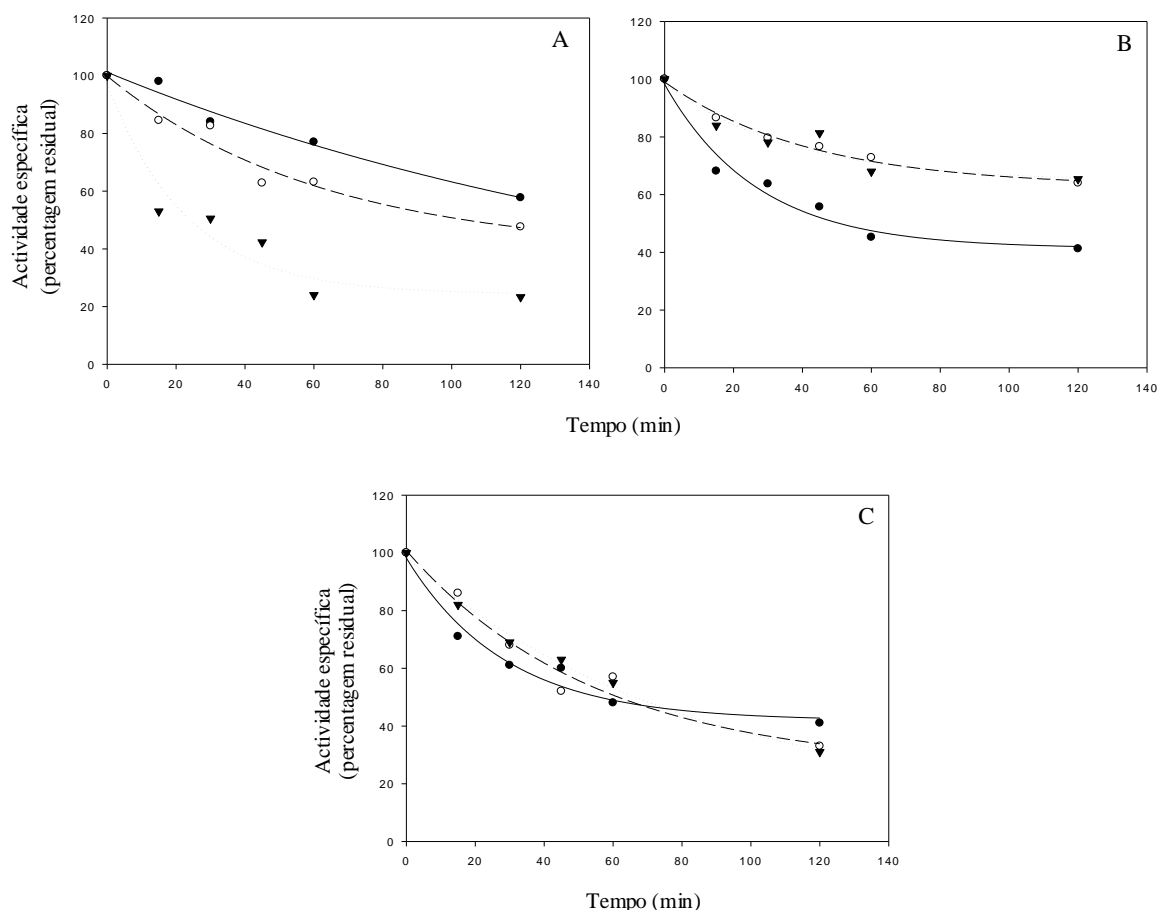


Figura 11 – Perfil de inativação das proteínas mutantes I65T (A), R261Q (B) e V388M (C) a 37°C, na ausência de chaperones (●; —) e na presença dos chaperones químicos glicerol a 1% (▼; ...) e TMAO a 5 mM (○; ---).

À semelhança do descrito para os ensaios de estabilidade térmica, não foi possível calcular de $t_{i1/2}$ da forma mutante R270K devido aos baixos níveis de actividade basal apresentado por esta enzima. Após 15 minutos de incubação a 37°C esta forma mutante não apresenta actividade residual pelo que foi impossível realizar um estudo comparativo.

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que quer a forma R261Q, quer a forma V388M apresentam um $t_{i1/2}$ inferior ao da proteína selvagem (≈ 160 min), ou seja de 66 e 69 min, respectivamente. Curiosamente, a proteína I65T apresenta um $t_{i1/2}$ de 152 min, um valor muito próximo do da 6xHis-hPAHwt. Esta característica tinha sido já descrita por Pey e colaboradores (Pey A *et al*, 2004), que referem para a I65T produzida *in vitro* num sistema *cell-free* (sistema TnT de transcrição-tradução) um valor de $t_{i1/2}$ ligeiramente superior ao da forma selvagem. Esta forma mutante apresenta um comportamento anómalo quando sintetizada na presença de glicerol ou de TMAO uma vez que o seu $t_{i1/2}$ diminui para valores de 31 e 104 min, respectivamente (figura 10A).

Pelo contrário as proteínas mutantes V388M e R261Q apresentam uma maior resistência quando produzidas na presença dos chaperones químicos em estudo, uma vez que os seus $t_{1/2}$ sobem para valores de ≈ 185 min, no caso da R261Q e de ≈ 74 min para a V388M.

Relativamente à proteína mutante I65T, os resultados obtidos são muito interessantes, na medida em que, apesar de na presença de chaperones a proteína revelar uma maior actividade residual, é muito menos resistente à inactivação térmica. Estes factos podem indicar que o aumento de actividade pode estar relacionado com uma alteração estrutural causada pelos chaperones, que tornem o centro activo mais acessível resultando num aumento da capacidade catalítica. No entanto, esta putativa alteração estrutural poderá causar uma maior susceptibilidade à inactivação térmica.

De um modo geral, as diferenças de comportamento das proteínas mutantes poderão estar relacionadas com a localização da mutação e com o seu efeito na conformação global da proteína, podendo os chaperones causar um efeito diferenciado, sempre mais acentuado em relação ao glicerol.

3.6. Avaliação do nível de expressão do sistema GroESL

O nível de expressão dos chaperones moleculares GroESL, após adição de glicerol a 1% ou de TMAO a 5 mM no momento da indução foi avaliado por análise de Western-blotting. Pela análise da figura 12 podemos concluir que a adição daqueles chaperones químicos ao meio de cultura não aumenta o nível de expressão da GroES/GroEL pelo que as alterações observadas nas proteínas 6xHis-hPAH mutantes têm como causa mais provável um efeito directo dos chaperones químicos sobre as proteínas recém-sintetizadas.

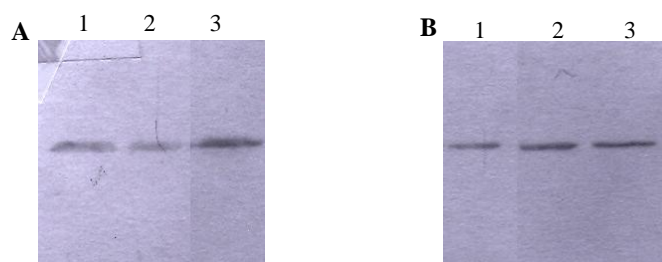


Figura 12 – Análise por Western-blotting do nível de expressão do sistema de chaperones moleculares GroES/GroEL na ausência (1) ou na presença dos chaperones químicos glicerol a 1% (2) ou TMAO a 5mM (3). (A) fracção solúvel; (B) fracção insolúvel.

4. Caracterização das formas tetraméricas

De modo a poder identificar os mecanismos biofísicos subjacentes ao fenómeno de estabilização observado, as forma tetraméricas das enzimas produzidas na presença de 1% de glicerol foram isoladas e caracterizadas.

Na figura 13 encontra-se representado o perfil cromatográfico obtido para as proteínas V388M, R261Q e I65T quando produzidas na ausência e na presença de glicerol. Como referido anteriormente (parágrafo 3.1), o efeito do glicerol manifesta-se na diminuição das formas agregadas e num aumento bastante significativo das formas tetraméricas (R261Q e V388M) ou diméricas (I65T), com uma aproximação ao perfil cromatográfico da 6xHis-hPAHwt (R261Q e V388M).

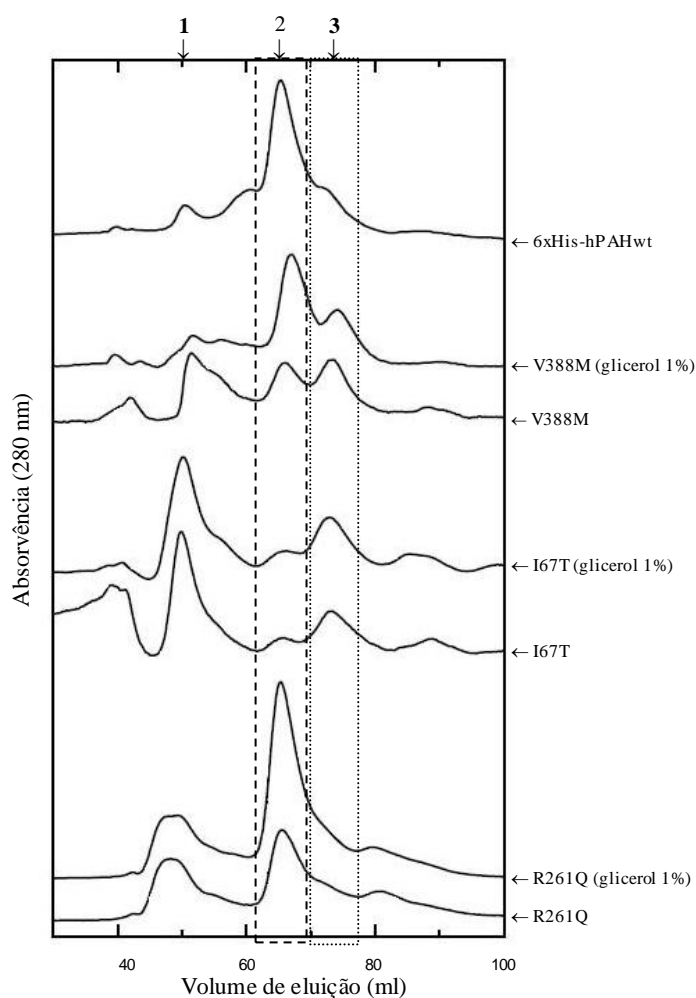


Figura 13 - Perfil cromatográfico (SEC) da proteína 6xHis-hPAHwt e formas mutantes I65T, R261Q e V388M produzidas na ausência e presença de glicerol a 1%. As formas agregadas (1), tetraméricas (2) e diméricas (3) encontram-se assinaladas.

4.1. Estrutura secundária

A análise do espectro de dicroísmo circular no Ultra-Violeta longínquo (180-230 nm; far-UV CD) permite detectar alterações na estrutura de macromoléculas, nomeadamente na estrutura secundária das proteínas. Nesta região do espectro as hélices- α , folhas- β e sequências não-estruturadas (*random-coil*) apresentam espectros de far-UV CD específicos. Deste modo, as estruturas em hélice- α caracterizam-se por apresentarem dois picos negativos, a 209 e 222 nm, as folhas- β um pico negativo a 218 nm e as estruturas *random coil* um pico positivo a 212 nm e um pico negativo a 195 nm (figura 14).

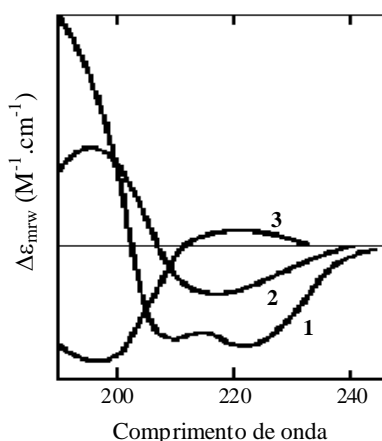


Figura 14 – Espectros de dicroísmo circular no UV longínquo das estruturas secundárias hélice- α (1), folha- β (2) e *random coil* (3). Adaptado de Arthur M. Lesk, *Introduction to protein Science*.

Com o objectivo de identificar possíveis alterações na estrutura secundária das proteínas mutantes, induzidas pela presença de glicerol aquando da sua síntese foram determinados os espectros de far-UV CD dos tetrâmeros isolados por SEC (figura 15).

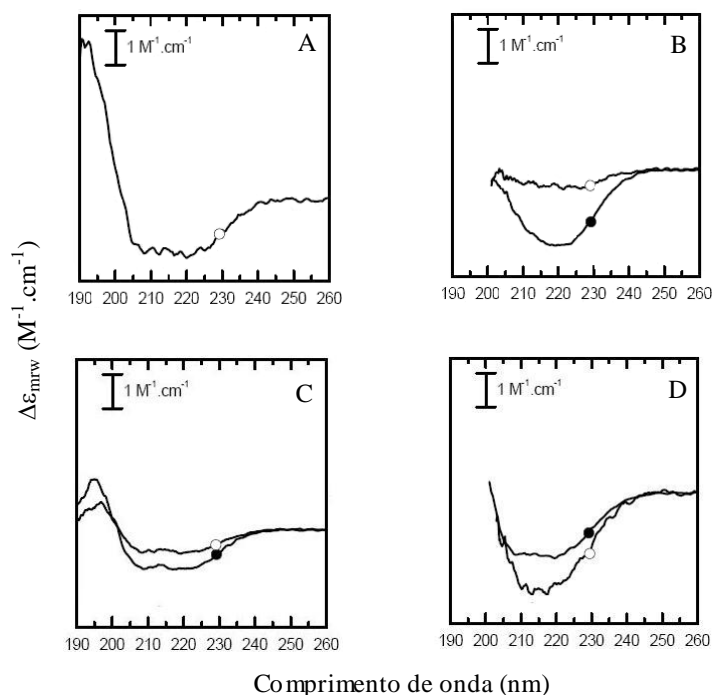


Figura 15 – Espectros de dicroísmo circular no UV longínquo das formas tetraméricas da 6xHis-hPAHwt (A) e das formas mutantes I65T (B), R261Q (C) e V388M (D) produzidas na ausência (○) e na presença de glicerol a 1% (●)

Assim, os resultados obtidos parecem sugerir que o glicerol tem a capacidade de contribuir para um ganho na estrutura secundária das proteínas mutantes I65T, R21Q e V388M. Quando comparado com o espectro de far-UV CD da 6xHis hPAHwt é visível uma aproximação ao perfil desta forma, com o aparecimento dos dois picos negativos (209 e 222 nm) característicos de uma proteína constituída maioritariamente por hélices- α .

Uma vez que a proteína I65T é maioritariamente constituída por dímeros, estas formas foram também isoladas e o seu espectro de far-UV CD foi também determinado. Como pode ser observado pela análise da figura 16 também no caso das formas diméricas pode ser observado um ganho na estruturação proteica com uma aproximação nítida ao espectro de uma proteína constituída por hélices- α .

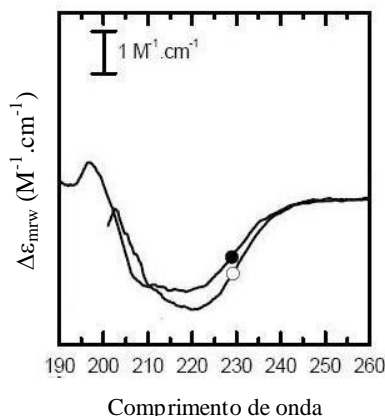


Figura 16 – Espectros de dicroísmo circular no UV longínquo da forma dimérica da proteína mutante I65T produzida na ausência (○) e na presença de glicerol a 1% (●)

4.2. Curvas de desnaturação

As curvas de desnaturação térmica foram efectuadas para as formas tetraméricas das proteínas I65T, R261Q e V388M utilizando quer o far-UV CD (figura 17) quer a fluorescência (figura 18) para determinar a fracção de proteína não nativa.

Relativamente aos ensaios efectuados por far-UV CD, é de salientar que, quando sintetizadas na ausência de chaperones químicos, apenas foi possível determinar o T_m da forma mutante R261Q ($\approx 55^\circ\text{C}$) (figura 17A), a qual apresentou um valor semelhante ao do calculado para a forma selvagem (56°C ; figura 17C). As formas mutantes I65T e V388M apresentaram uma resposta heterogénea característica de proteínas com um nível de estruturação baixo (figura 17B e D). Nas três formas mutantes estudadas o efeito da presença de glicerol aquando da sua síntese, é visível não ao nível do T_m calculado mas sim ao nível da cooperatividade das transições entre o estado nativo e o estado desnaturado. Na realidade, para as proteínas sintetizadas na presença de 1% de glicerol, o T_m calculado foi de 58, 53 e 50°C para a I65T, R261Q e V388M, respectivamente.

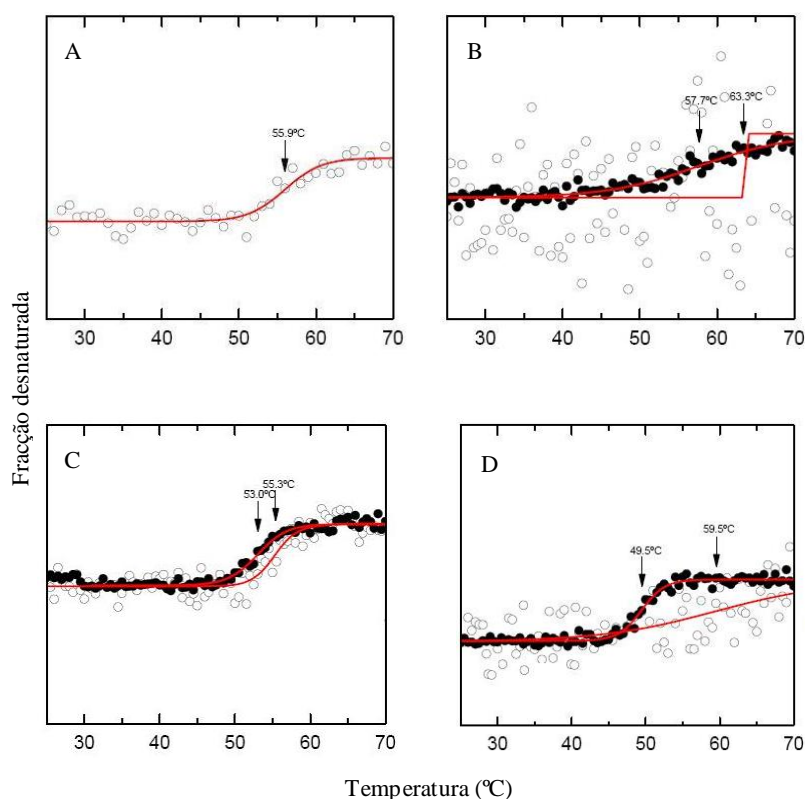


Figura 17 - Curvas de desnaturação térmica, obtidas por far-UV CD, das proteínas 6xHis-hPAH, produzidas na ausência (○) ou na presença de glicerol (●). (A) proteína selvagem; (B) proteína mutante I65T; (C) proteína mutante R261Q e; (D) proteína mutante V388M.

A desnaturação térmica, monitorizada por fluorescência (figura 18) aponta para conclusões semelhantes aos dos ensaios de far-UV CD. Também neste caso, o glicerol actua sobre as proteínas PAH mutantes com um efeito mais visível a nível da cooperatividade de transições do que no valor do T_m .

Relativamente às proteínas mutantes produzidas na ausência de glicerol, é também visível uma semelhança entre o perfil de desnaturação da forma R261Q (figura 18B) com o da forma selvagem (figura 18A) que apresenta um T_m de 58°C.

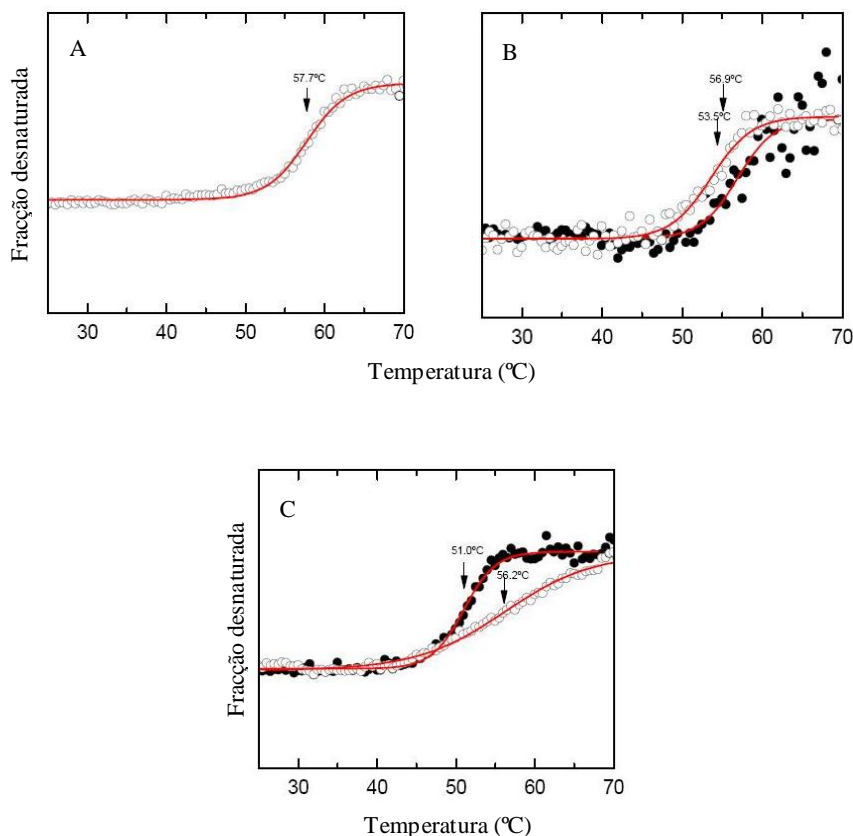


Figura 18 – Curvas de desnaturação térmica, obtidas por fluorescência, das proteínas 6xHis-hPAH, produzidas na ausência (○) ou na presença de glicerol (●). (A) proteína selvagem; (B) proteína mutante R261Q (C) proteína mutante V388M.

4.3. Acessibilidade dos resíduos de triptofano

Na presença de KI, as proteínas estudadas apresentaram, nos gráficos de Stern-Volmer, curvas de *quenching* não-lineares típicas de proteínas constituídas por uma população de resíduos de Trp com diferentes acessibilidades. O valor de K_{sv} e a fração acessível ao quenching (f_a) foram determinados utilizando a equação modificada de Stern-Volmer.

Os resultados obtidos (tabela 2) indicam que o valor de f_a das formas mutadas, parece aumentar, na maioria dos casos, quando a proteína é produzida na presença de glicerol, aproximando-se do valor da proteína wt, para ambos os *quenchers* utilizados, o que poderá significar que a conformação das proteínas mutadas, produzidas na presença de glicerol, se aproximará da conformação da proteína wt. No caso da proteína R261Q ocorre também um incremento no K_{sv} para a acrilamida o que indicará que os resíduos internos estarão menos protegidos da acrilamida. Com KI, no entanto, verifica-se o fenómeno oposto.

Tabela 2 - Constantes de quenching das formas tetraméricas das proteínas mutantes I65T, R261Q e V388M produzidas na ausência e na presença de glicerol a 1%, obtidas com a acrilamida e com o KI.

	KI		Acrilamida
	f_a	K_{sv} (M ⁻¹)	K_{sv} (M ⁻¹)
I65T	-	-	-
I65T (glicerol a 1%)	0,301	6,901	8,347
R261Q	0,237	2,229	4,019
R261Q (glicerol a 1%)	-	0,434	15,187
V388M	-	5,525	10,186
V388M (glicerol a 1%)	0,744	5,722	5,663

A análise global destes resultados indica, que a produção das proteínas mutadas na presença de glicerol aproxima-las-á do perfil da proteína wt, quanto à exposição dos resíduos susceptíveis de serem afectados pelo fenómeno de *quenching*.

5. Discussão

Os chaperones químicos são considerados como potenciais agentes estabilizadores da estrutura proteica. No entanto, a maior parte dos estudos efectuados referem-se à sua acção *in vitro*. De modo a que possa ser investigada a sua potencial utilização como agentes terapêuticos em doenças conformacionais, e particularmente na PKU, torna-se necessário determinar a sua eficácia e elucidar o seu mecanismo estabilizante *in vivo*. A estratégia laboratorial desenvolvida neste trabalho permitiu produzir e purificar, em larga escala, proteínas mutantes sintetizadas na presença de diferentes chaperones químicos, possibilitando, deste modo, a sua caracterização. Foi possível efectuar um rastreio de compostos que pudessem restaurar a actividade de formas mutantes mais comuns na população PKU portuguesa e que não afectam resíduos directamente envolvidos na catálise enzimática, nomeadamente as formas I65T, R261Q, V388M e R270K. De entre os quatro agentes testados (glicerol, TMAO, taurina e 4-PBA), apenas o 4-PBA não apresentou capacidade de recuperar a actividade das enzimas em estudo. Estes resultados vêm corroborar dados recentes, realizados em células eucariotas, que indicam que a capacidade de estabilização de proteínas mutadas, apresentada pelo 4-PBA é resultado de um efeito sobre: (1) a expressão do sistema de

chaperones moleculares Hsp (Wright JM *et al*, 2004) e; (2) a regulação das caspases envolvidas na apoptose (Gardian G *et al*, 2005). A ausência de resposta, no nosso modelo de estudo, pode indicar que as células procariotas o não apresentam os sistemas atrás mencionados e que por isso não respondem ao 4-PBA. No entanto, tendo em consideração os efeitos biológicos descritos para este composto seria interessante investigar a possível acção do 4-PBA sobre proteínas PAH mutantes num sistema de expressão eucariota.

Relativamente à resposta obtida com o glicerol, TMAO e taurina, esta parece depender não só da forma mutante mas também do agente em causa. O glicerol e o TMAO parecem apresentar um efeito mais “universal” uma vez que a sua inclusão no meio de cultura conduziu ao aumento da actividade de todas as enzimas estudadas. Por outro lado, as formas mutantes I65T e R270K parecem mais dependentes do agente estabilizante em causa uma vez que não responderam à adição de taurina. Assim, estes resultados podem indicar que algumas formas mutantes poderão apresentar uma resposta osmólito-específica, que deverá ser resultado da presença de formas conformacionais mais resistentes à estabilização pelos chaperones químicos. Esta resistência poderá estar directamente relacionada com a alteração no valor da área superficial acessível ao solvente (ASA) introduzida pela mutação. Quando comparados os valores de ASA da proteína selvagem e das formas mutadas pelo programa NETASA (Ahmad S *et al*, 2002), verificámos que a substituição introduzida induziu uma alteração no valor de ASA em 7 aminoácidos vizinhos do resíduo afectado (tabela 3). As proteínas mutantes mais resistentes à estabilização pelos chaperones químicos sofreram um aumento no valor médio do ASA, enquanto que as formas mutantes que melhor responderam à adição de chaperones químicos no meio de cultura são aquelas que apresentam uma alteração negativa no valor de ASA (tabela 3).

Tabela 3 – Alteração prevista na área superficial acessível (ASA) para as mutações I65T, R261Q, R270K e V388 e número de resíduos afectados.

	Nº de resíduos afectados	Alteração no valor médio de ASA ⁽¹⁾ (Å)
I65T	7	+ 10
R270K	7	+ 7,11
R261Q	7	+ 0,04
V388M	7	- 2,7

⁽¹⁾ O cálculo do valor de ASA foi efectuado recorrendo ao programa NETASA (<http://www.netasa.org/>).

Estes resultados sugerem que os osmólitos naturais poderão ser mais eficientes na recuperação da função biológica de proteínas mutantes (mutações *missense*) que apresentem os aminoácidos mutados mais mergulhados no interior da proteica.

No nosso estudo, o glicerol e o TMAO induziram uma diminuição da percentagem de formas agregadas das proteínas mutantes em estudo, bem como alterações no equilíbrio oligomérico da hPAH. Adicionalmente foram observadas alterações significativas na estrutura secundária das formas tetraméricas (mais activas) resultando em formas mais estruturadas. Paralelamente foi constatado que algumas das propriedades das proteínas mutadas produzidas na presença dos chaperones, parecem aproximar-se das propriedades da proteína selvagem (como indicam as experiências de *quenching* e desnaturação térmica). Esse efeito será resultado de uma acção directa sobre as proteínas mutantes recém-sintetizadas e não sobre a regulação da expressão de genes envolvidos no *folding* intracelular; uma vez que demonstrámos (num sistema de expressão dupla) que a adição daqueles agentes, no momento da indução proteica não altera o nível de expressão dos chaperones moleculares. Deste modo, podemos postular que a presença de osmólitos no momento da síntese da cadeia polipeptídica mutada irá proteger a proteína de ser identificada como forma *misfolded*, a qual seria reconhecida pelo sistema de controlo de qualidade intracelular ou ir-se-ia acumular na forma de agregados. Ao serem excluídos da superfície da molécula proteica, os chaperones químicos irão proporcionar o ambiente óptimo que permite a estabilização de um estado de *folding* intermédio (I) entre a forma nativa (N) e a forma desnaturada (D), estado esse mais estruturado e mais “aberto”, menos susceptível de sofrer agregação.

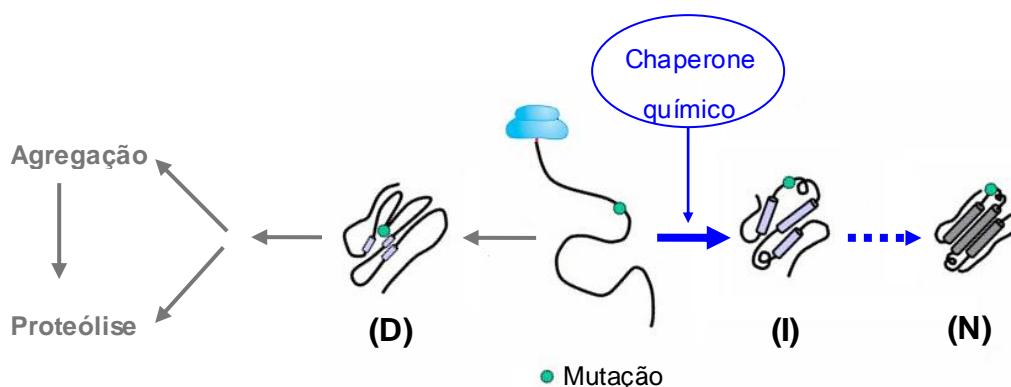


Figura 19 – Modelo proposto para a actuação dos chaperones químicos sobre proteínas mutantes estruturalmente afectadas. D representa a forma desnaturada da proteína, I um estado intermédio e N a forma nativa. Na presença dos chaperones químicos a via que conduz à formação de agregados e/ou proteólise (a cinzento) é deslocada no sentido da formação de espécies intermédias mais estruturadas e mais estáveis (a azul). A forma nativa poderá não ser atingida.

Capítulo III

PRODUÇÃO DE FORMAS

QUIMÉRICAS DA FENILALANINA

HIDROXILASE HUMANA RECOMBINANTE

1. INTRODUÇÃO

Uma das estratégias mas utilizadas para melhorar a estabilidade e função de proteínas consiste em alterar artificialmente resíduos específicos de aminoácidos (Matsuura T e Yomo T, 2006). As proteínas quiméricas, assim produzidas, apresentam um vasto campo de utilização que vai desde a sua aplicação a nível industrial (Ogino H e Ishikawa H, 2001) até à sua utilização como produtos farmacêuticos (Sidhu SS, 2000). A modificação de proteínas constitui ainda uma ferramenta essencial para compreender as propriedades biofísicas e funcionais destas macromoléculas (Voigt CA *et al*, 2000).

Presentemente, podem ser utilizadas várias aproximações laboratoriais para produzir proteínas com propriedades funcionais e/ou estruturais melhoradas. Uma das estratégias consiste em mutagenizar aleatoriamente uma célula (eucariota ou procariota) de interesse, originando uma biblioteca de genes mutantes. Seguidamente procede-se à análise das proteínas expressas, sendo seleccionadas as que apresentem as características pretendidas (Matsuura T e Yomo T, 2006) que podem incluir as propriedades catalíticas (Ni J *et al*, 2002) e/ou de estabilidade (Nakamura A *et al*, 2005) ou elevados níveis de (Ju J *et al*, 2005). Outra aproximação consiste na alteração da carga superficial da proteína ou na modificação de resíduos de aminoácidos que possam contribuir para a instabilidade proteica (Fágáin CO, 2003).

Relativamente à fenilalanina hidroxilase não se encontram descritas proteínas quiméricas que apresentem uma maior estabilidade e/ou funcionalidade uma vez que os estudos efectuados até à data têm incidido na caracterização de formas mutantes patogénicas. Deste modo, o nosso trabalho teve como finalidade identificar e caracterizar proteínas PAH quiméricas que apresentassem uma maior estabilidade e/ou actividade. A selecção dos resíduos, alvos de mutação, obedeceu fundamentalmente a dois critérios: (1) os aminoácidos não se encontrarem directamente relacionados com a função enzimática (por exemplo não se situarem no sítio catalítico); (2) a substituição do aminoácido induzir uma alteração da carga superficial da proteína ou condicionar a possível oxidação de resíduos de Cys. Assim, foram desenhadas as proteínas quiméricas C29S, C284S, C445S, C29D, D145K, D151K, E181K e E360K.

2. PRODUÇÃO DE FORMAS QUIMÉRICAS DA FENILALANINA HIDROXILASE HUMANA

2.1. Construção de cDNAs mutantes

Os cDNAs mutantes foram construídos utilizando a técnica da mutagénesse dirigida a qual permite alterar sequências específicas (mutações pontuais, inserções de deleções) de um DNA molde, de modo não aleatório.

Numa primeira fase, a correcta introdução das mutações C29D, C29S, C284S, C445S, D145K, D151K e E360K foi rastreada por digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição apropriadas (tabela 1), uma vez que a introdução das mutações pretendidas conduz ao aparecimento ou eliminação do sítio de reconhecimento daquelas enzimas. A mutação E181K não pôde ser rastreada por ensaios de restrição, visto que a alteração introduzida não é identificada por nenhuma das enzimas de restrição disponíveis no mercado.

Tabela 1 – Enzimas de restrição utilizadas para rastreio das alterações introduzidas por mutagénesse dirigida e tamanho dos fragmentos obtidos para a amostra de cDNAwt (SN) ou de cDNA mutantes (SM).

Mutação	Enzima de restrição	Fragmentos obtidos (bp)
C29D	<i>HpyCH4V</i>	SN: 319/237/53 SM: 319/290
C29S	<i>TaqαI</i>	SN: 346/19 SM: 217/129/19
D145K	<i>DdeI</i>	SN: 339/151 SM: 339/126/25
D151K	<i>MboI</i>	SN: 177/163/107/43 SM: 270/177/45
C284S	<i>Hpy188III</i>	SN: 342/117/64/45 SM: 243/117/99/64/45
E360K	<i>Hpy188I</i>	SN: 192/146/101/77/54/53/27 SM: 287/146/77/54/53/27
C445S	<i>TaqαI</i>	SN: 200 SM: 114/86

A análise do perfil electroforético obtido após digestão com as enzimas referidas na tabela 1 permitiu assim identificar os cDNAs onde ocorreu a correcta introdução da mutação pretendida (figura 1).

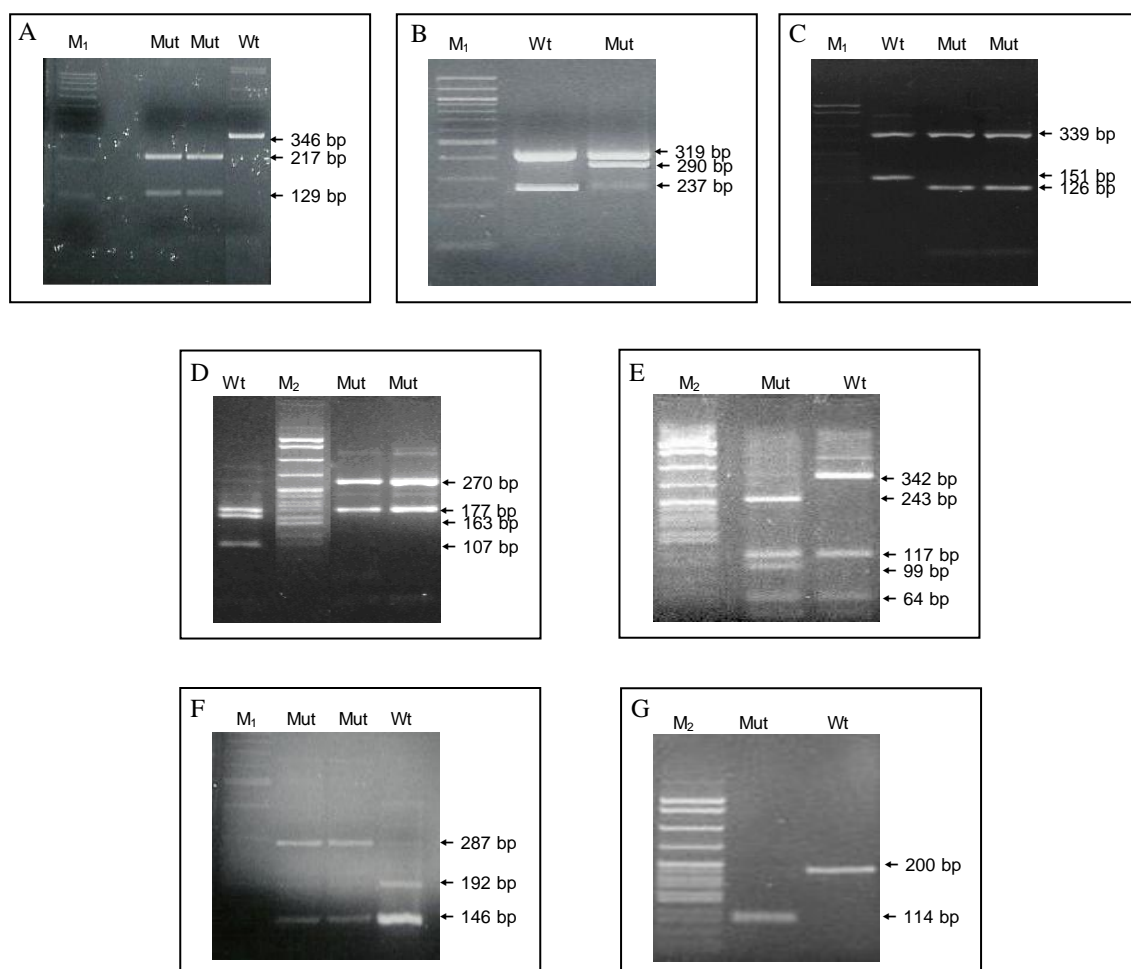


Figura 1 - Controlo da estrutura dos DNAs obtidos por mutagénese dirigida. Análise dos fragmentos dos produtos de PCR hidrolisados com enzimas de restrição específicas, para detecção das mutações C29S (A), C29D (B), D145K (C), D151K (D), C284S (E), E360K (F) e C445S (G). (Wt) forma selvagem do cDNA PAH; (Mut) formas mutantes; (M₁) Marcador de massas moleculares 100 Base-Pair Ladder; (M₂) Marcador de massas moleculares *pBR322DNA-MspI Digest*.

De entre as amostras de cDNA mutagenizado, que após o rastreio apresentaram o perfil electroforético correspondente à introdução da alteração pretendida, foi seleccionada apenas uma, a qual foi sequenciada na sua totalidade, não só para confirmar a presença da mutação, mas também para excluir a ocorrência de mutações adicionais introduzidas durante a reacção de mutagénese dirigida. Uma vez que não foi possível efectuar o rastreio prévio para a mutação E181K, foram seleccionadas três amostras de cDNA as quais foram submetidas a sequenciação. Os resultados obtidos,

ilustrados na figura 2, permitiram então confirmar as substituições nucleótídicas pretendidas e excluir a presença de mutações adicionais.

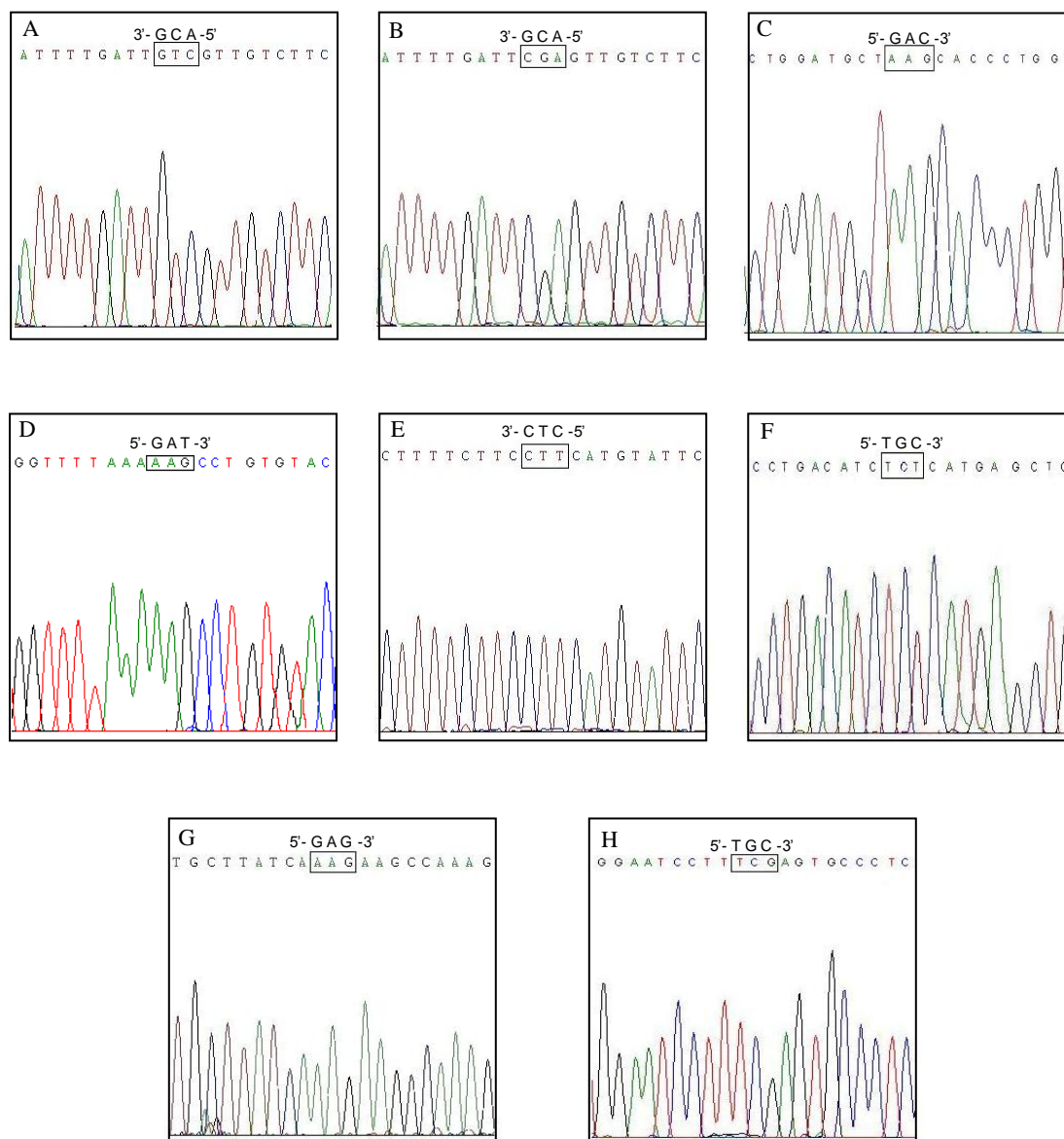


Figura 2 - Sequenciação do DNA obtido por reacção de mutagénese dirigida. Mutações C29D (A), C29S (B), D145K (C), D151K (D), E181K (E), C284S (F), E360K (G) e C445S (H). O codão normal encontra-se representado para cada mutação.

2.2. Expressão das proteínas mutantes

Após purificação por IMAC, as proteínas recombinantes foram analisadas por electroforese em SDS-PAGE (figura 3) de modo a determinar quer a massa molecular quer o grau de pureza das proteínas expressas.

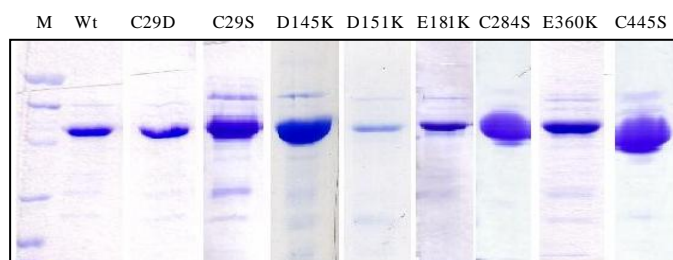


Figura 3 – Análise por SDS-PAGE da forma selvagem (Wt) e formas mutantes quiméricas C29D, C29S, D145K, D151K, E181K, C284S E360K e C445S, da proteína recombinante 6xHis-PAH após purificação por IMAC. (M) marcador de massas moleculares “Unstained SDS-PAGE Standards”.

Na tabela 2 são apresentados os valores do rendimento e do grau de pureza das proteínas quiméricas em estudo e comparados com os da forma selvagem.

Tabela 2 – Rendimento e grau de pureza da forma selvagem e formas mutantes quiméricas da 6xHis-hPAH.

	Rendimento ⁽¹⁾ (mg)	Aumento relativo ⁽²⁾	Grau Pureza (%)
6xHis-hPAHwt	0,5	-	>90
C29D	0,5	1	>90
C29S	2	4	>95
C284S	2,8	5,6	>95
C445S	3,4	6,8	>95
D145K	3	6	>95
D151K	0,25	0,5	≈88
E181K	1	2	≈90
E360K	2	4	>90

⁽¹⁾ Calculado em relação à proteína obtida no primeiro eluído a partir de 1 litro de meio de cultura; ⁽²⁾ Relativo à 6xHis-hPAHwt. Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

Como se pode concluir pela análise dos resultados apresentados na tabela 2, à excepção das formas C29D, D151K e E181K, todas as outras formas mutantes apresentam um rendimento de expressão superior ao da forma selvagem. Como seria de esperar apenas estas mutações são isoladas com um grau de pureza que ronda os 90%.

2.3. Avaliação da actividade enzimática

A actividade enzimática das proteínas quiméricas foi determinada de acordo com o descrito na Parte II, parágrafo 5.6.1. Foi também incluído neste estudo, como controlo dos ensaios efectuados, a proteína mutante V388M, uma forma patogénica ($\approx 25\%$ de actividade residual) bem caracterizada neste sistema de expressão (Leandro P *et al*, 2000).

Em condições padrão (1mM L-Phe, 500 μ M 6MPH₄), e quando comparadas com a actividade da forma selvagem, as formas mutantes C29S, C284S, C445S, D145K e E360K apresentaram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,005$; tabela 3, figura 4). O maior incremento da actividade residual foi observado para as substituições C \rightarrow S, nomeadamente de 2,8 vezes, 3,5 vezes e 3,4 vezes, para as formas mutantes C29S, C284S e C445S, respectivamente.

Tabela 3 – Actividade específica da proteína 6xHis-hPAHwt, formas quiméricas e forma mutante V388M.

	Actividade específica (nmolTyr.min ⁻¹ .mg ⁻¹) $\bar{X} \pm SD$	$p^{(1)}$	Aumento relativo ⁽²⁾
6xHis-hPAHwt	2147 \pm 146	-	-
C29D	3127 \pm 989	> 0,01	1,5
C29S	5932 \pm 629	< 0,0005	2,8
C284S	7526 \pm 941	< 0,001	3,5
C445S	7239 \pm 774	< 0,0005	3,4
D145K	3790 \pm 357	< 0,002	1,8
D151K	629 \pm 73	< 0,01	0,32
E181K	2755 \pm 545	> 0,01	1,3
E360K	3893 \pm 288	< 0,005	1,8
V388M	538 \pm 43	< 0,01	0,25

⁽¹⁾ Determinado utilizando o teste de t de Student, relativamente ao valor de actividade enzimática do 6xHis-hPAHwt, com um intervalo de confiança de 95%; ⁽²⁾ Relativo à 6xHis-hPAHwt. Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μ M 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

É de realçar que, de entre as proteínas desenhadas, apenas a forma mutante D151K apresentou uma actividade residual 32% inferior à da forma selvagem (tabela 3, figura 4).

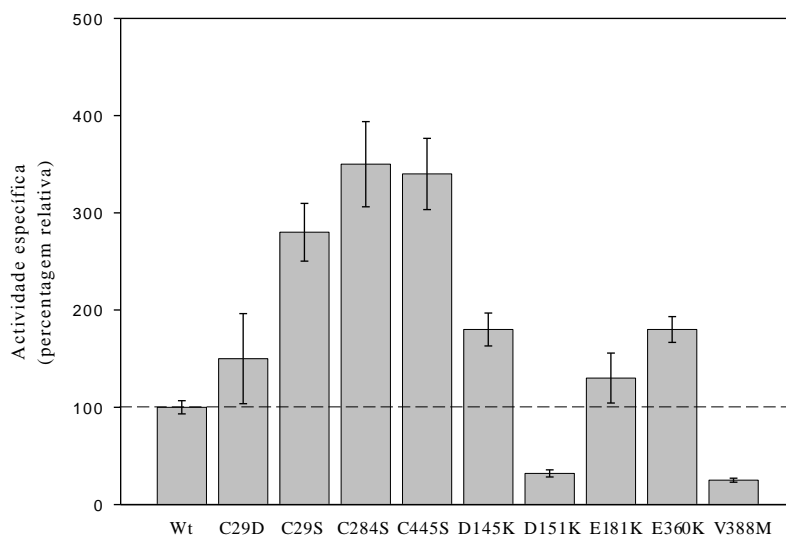


Figura 4 – Actividades residuais das diversas formas de proteínas 6xHis hPAH recombinantes. As percentagens foram calculadas em relação à forma selvagem (100%). Os ensaios foram realizados em condições padronizadas (1 mM L-Phe; 500 μ M 6-MPH₄). Cada resultado representa a média de 3 ensaios independentes.

Face aos resultados obtidos foram seleccionadas as enzimas quiméricas C29S, C284S, C445S, D145K e E360K para uma caracterização mais detalhada.

2.4. Determinação do perfil de oligomerização

Uma vez que uma das características mais importantes da fenilalanina hidroxilase reside na sua estrutura quaternária (tetrâmeros \leftrightarrow dímeros) foi examinado o perfil de oligomerização das proteínas seleccionadas e calculada a percentagem relativa das diferentes estruturas quaternárias identificadas (tabela 4).

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que apenas as proteínas C29S e E360K apresentam um perfil de oligomerização semelhante ao da forma selvagem, com uma relação tetrâmeros \leftrightarrow dímeros de 45% \leftrightarrow 10% e 55% \leftrightarrow 11%, respectivamente.

As proteínas mutantes C284S e D145K apresentam o referido equilíbrio deslocado para a forma dimérica (26%↔38% para a C284S e 63%↔35% para a D145K), enquanto que para a proteína C445S apenas foram identificadas formas diméricas (99%).

Tabela 4 – Percentagem relativa das diferentes formas oligoméricas das proteínas 6xHis-hPAH quiméricas sem activação pelo substrato e após incubação com a L-Phe.

	Activação (L-Phe)	6xHis-hPAHwt	C29S	C284S	C445S	D145K	E360K
Agregados	-	18	11	2	1	-	12
	+	16	13	3	0	3	13
Hexâmeros/ Octâmeros	-	10	25	-	-	-	22
	+	4	15	-	-	-	18
Tetrâmeros	-	56	49	40	-	63	55
	+	75	66	80	-	77	60
Dímeros	-	16	10	58	99	35	11
	+	5	6	16	100	19	9

2.5. Espectros de fluorescência

Os espectros de fluorescência obtidos para as enzimas quiméricas C29S, C284S, C445S, D145K e E360K, na ausência de L-Phe e após pré-activação com o substrato, encontram-se documentados na figura 5. Assim, foi possível constatar que na ausência do substrato L-Phe, ao comprimento de onda de excitação de 295 nm, as formas C445S e E360K apresentavam um máximo de emissão aos comprimentos de onda 340 e 338 nm, respectivamente. Todas as outras proteínas mutantes apresentavam um máximo de emissão de fluorescência de aproximadamente 330 nm (λ_{exc} de 295 nm). Apenas a forma mutante C445S, que se encontra exclusivamente na forma dimérica (tabela 4), não sofreu deslocação no seu máximo de emissão após incubação com a L-Phe (figura 5C).

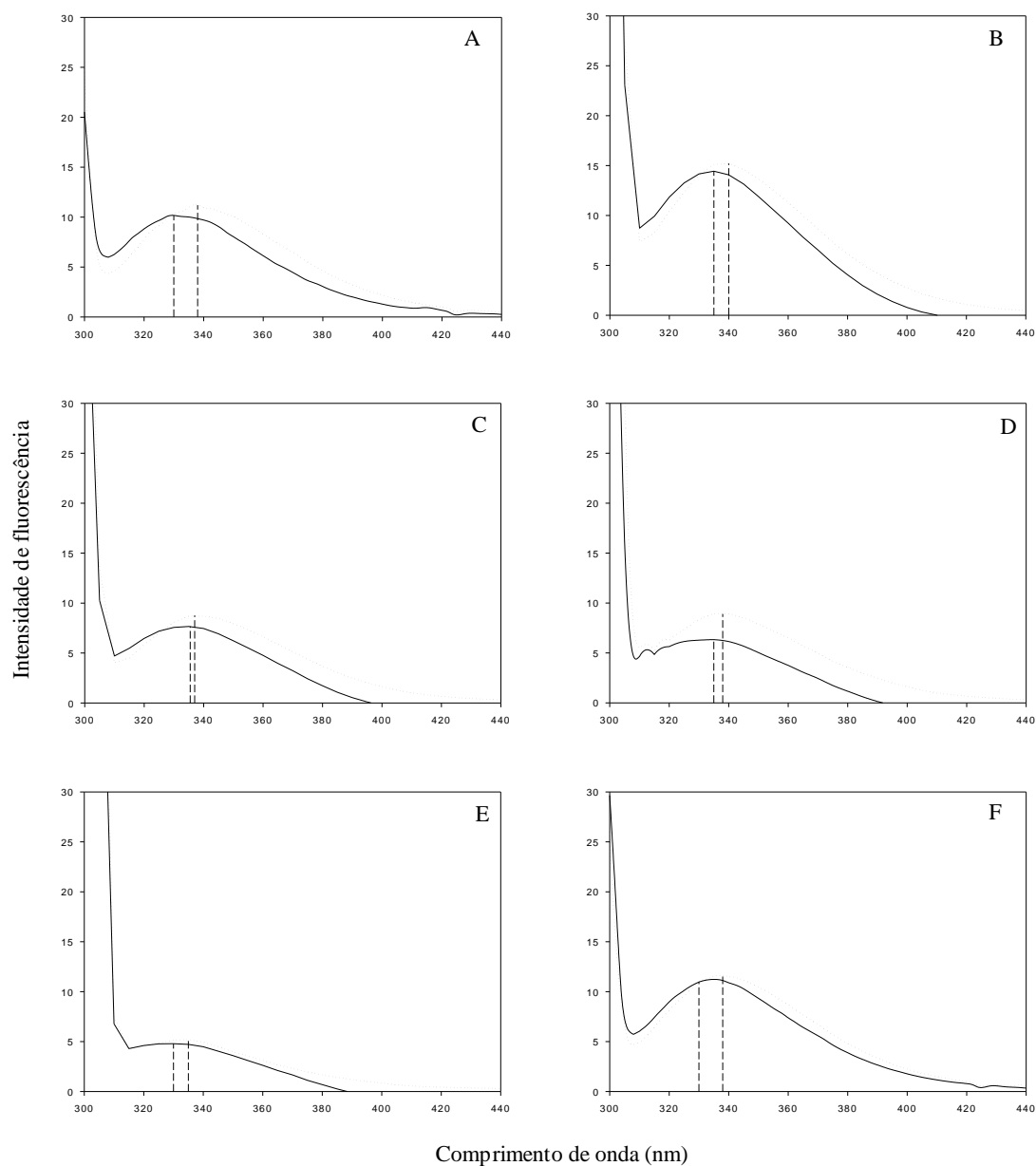


Figura 5 – Espectro de emissão de fluorescência das enzimas quimérica C29S (A), C284S (B), C445S (C), D145K (D), D151K (E) e E360K (E), sem (—) e com activação com 1mM de L-Phe (---). Os comprimentos de onda máximo de emissão encontram-se assinalados.

2.6. Perfil de estabilidade térmica

A maioria das mutações patogénicas, identificadas hPAH originam proteínas estruturalmente instáveis (Erlandsen e Stevens, 1999) que apresentam valores de T_m inferiores ao calculado para a forma selvagem.

Deste modo, para avaliar a estabilidade térmica das enzimas quiméricas produzidas foram determinados os seus T_m . O valor calculado para a proteína C29S é igual ao determinado para a forma selvagem (52°C). No entanto, as enzimas C284S, C445S e E360K apresentam uma diminuição no T_m (47,5°C para a C284S, 48°C para a E360K e 49°C para a C445S). Este resultado poderá indicar uma maior instabilidade estrutural destas formas.

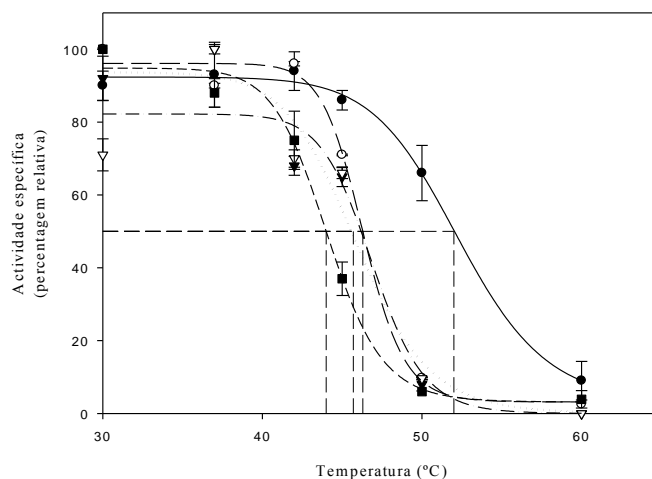


Figura 6 – Perfil de estabilidade térmica da forma selvagem (●; —) da enzima recombinante 6xHis-hPAH e formas mutantes C29S (○; —), C284S (▼; ...), C445S (▽; -.-) e E360K (■; ---).

Tendo em conta os dados experimentais, nomeadamente o T_m apresentado, o incremento da actividade enzimática e o perfil de oligomerização, foram seleccionadas as proteínas quiméricas C29S e a E360K para proceder a uma caracterização bioquímica mais completa.

2.7. Características enzimáticas

Como referido anteriormente, uma das características mais relevantes da hPAH consiste na resposta sigmoideal a diferentes concentrações do substrato L-Phe. Deste modo, foi determinada a cinética de resposta à L-Phe e a razão de activação das formas C29S e E360K (figura 6).

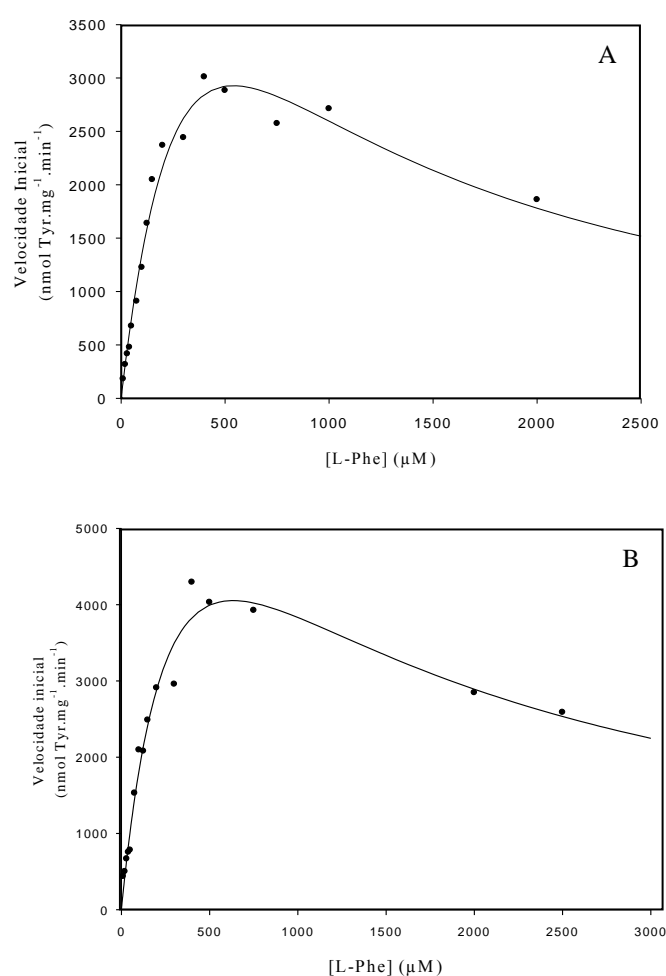


Figura 7 – Efeito da concentração de L-Phe sobre a actividade catalítica das proteínas recombinantes C29S (A) e E360K (B). A actividade foi determinada em condições padrão (75 μM BH₄).

A enzima C29S apresenta o perfil característico da forma selvagem (figura 6A), ou seja, um comportamento sigmoideal para concentrações baixas de substrato (<500

μM) e uma inibição para concentrações mais elevadas de L-Phe ($>750 \mu\text{M}$). A enzima E360K, embora revelando estar sujeita à inibição pelo substrato (também para valores superiores a $750 \mu\text{M}$) não apresentou uma resposta sigmoideal à variação da concentração de substrato (figura 4B) e que se traduziu por um valor de coeficiente de Hill (h) próximo de 1.

Os parâmetros cinéticos determinados, apresentados na tabela 5, demonstram que a forma C29S apresenta uma eficiência catalítica ($k_{\text{cat}}/S_{0,5}$) de $1,2 \mu\text{M}^{-1}.\text{min}^{-1}$, valor superior ao da forma selvagem ($0,29 \mu\text{M}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Este incremento é devido ao aumento da V_{max} ($3355 \text{ nmol Tyr}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) e da afinidade para o substrato ($S_{0,5}$ de $128 \mu\text{M}$). O valor relativamente baixo da razão de activação indica que a proteína poderá existir num estado parcial de pré-activação, o que também poderá explicar o valor ligeiramente mais baixo do valor de h (1,5), quando comparado com a forma selvagem (h de 1,8).

A enzima E360K apresenta um V_{max} ($4689 \text{ nmol Tyr}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) superior à da forma selvagem ($1000 \text{ nmol Tyr}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) (tabela 5). No entanto, a sua afinidade para o substrato ($S_{0,5}$ de $209 \mu\text{M}$) é inferior à da enzima C29S ($S_{0,5}$ de $128 \mu\text{M}$), resultando numa menor eficiência catalítica ($1,0 \mu\text{M}^{-1}.\text{min}^{-1}$). É de salientar o valor relativamente baixo da razão de activação (0,89) que associado ao valor do coeficiente de Hill poderão indicar que esta enzima existe numa forma pré-activada.

Tabela 5 – Propriedades cinéticas da 6xHis hPAHwt e formas quiméricas C29S e E360K.

	V_{max} ($\text{nmol Tyr}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	$S_{0,5}\text{L-Phe}$ (μM)	h	$K_{\text{cat}}/S_{0,5}^{(2)}$ ($\mu\text{M}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Razão de Activação ⁽³⁾
6xHis-hPAHwt ⁽¹⁾	1000	186	1,8	0,29	3,3
C29S	3355	128	1,5	1,2	1,5
E360K	4689	209	1,0	1,0	0,89

⁽¹⁾ De acordo com Leandro P, 2000. ⁽²⁾ $k_{\text{cat}}/S_{0,5}$ representa a eficiência catalítica das enzimas purificadas e foi determinada utilizando a massa molecular de 55 kDa para a enzima recombinante. ⁽³⁾ representa a razão entre a actividade enzimática determinada com 1 min de pré-incubação pela L-Phe e a actividade enzimática determinada sem pré-activação pela L-Phe. Os ensaios foram efectuados em condições padronizadas ($75 \mu\text{M BH}_4$).

2.8. Proteólise com tripsina

A resistência da enzima hPAH (forma selvagem e diferentes formas mutantes) à acção da tripsina (proteólise limitada) fornece informações importantes sobre a sua

conformação (Solstad *et al*, 2000; Bjorgo *et al*, 1998). A maior susceptibilidade à proteólise parece indicar que a proteína apresenta uma alteração na estrutura terciária que se traduz numa maior exposição de determinados resíduos (maior abertura na estrutura) (Bjorgo *et al*, 1998). Os resultados obtidos, apresentados na figura 7, indicam claramente que a enzima E360K é menos resistente à acção da tripsina do que a forma C29S. Esta última é mesmo mais resistente à proteólise do que a forma selvagem. Após 15 min de digestão com a tripsina foi possível detectar cerca de 59%, 83% e 85% de proteína intacta das formas E360K, C29S e selvagem, respectivamente. Após 30 min de proteólise, cerca de 58% de E360K, 72% da forma selvagem e 79% de C29S mantinham ainda a sua integridade. Estes resultados indicam que a enzima E360K parece apresentar uma alteração conformacional que poderá estar relacionada com o seu estado de pré-activação.

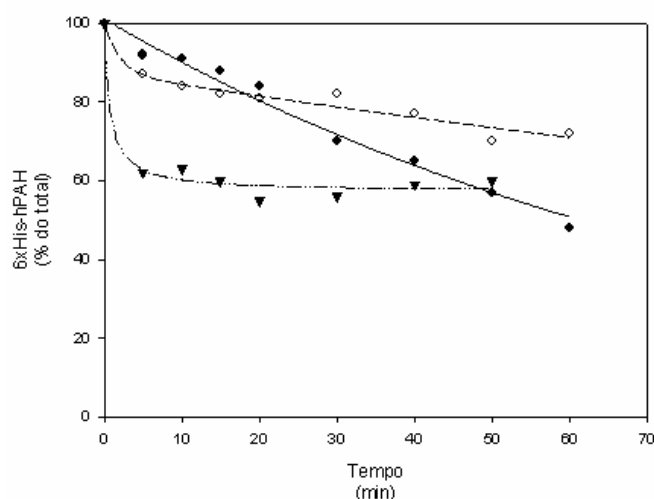


Figura 8 – Quantidade de proteína recombinante 6xHis hPAH resistente à proteólise pela tripsina. (—) forma selvagem; (---) C29S; (-.-) E360K.

2.9. Ensaio de desnaturação com ureia

A variação da energia livre de Gibbs entre o estado nativo e o estado desnaturado (ΔG) é uma medida da estabilidade conformacional de uma proteína. Assim, foi determinado o valor de ΔG para as proteínas quiméricas C29S e E360K, utilizando o modelo proposto por Green e Pace (Green e Pace, 1974) e de acordo com a equação 9 (Parte III, parágrafo 5.8.1).

Relativamente à proteína selvagem, a curva de desnaturação com a ureia, e de acordo com o descrito por Kleppe e colaboradores (Kleppe *et al*, 1999), apresentou o perfil característico, seguindo o modelo de três estados. De acordo com os resultados obtidos, (figura 8) também as formas mutantes C29S e E360K seguem este modelo.

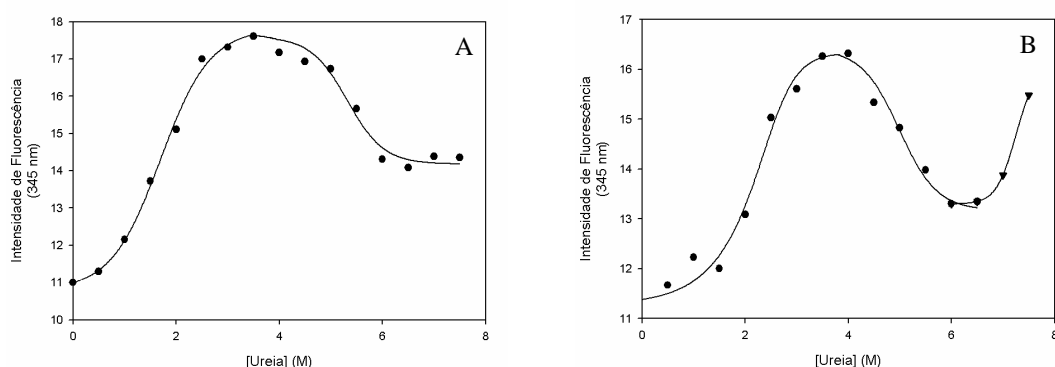


Figura 9 – Curvas de desnaturação com ureia das proteínas recombinantes 6xHis hPAH C29S (A) e E360K (B)

Foram então calculados os parâmetros de ΔG^0 , m e C_m (tabela 6) considerando dois estados de transição (Kleppe *et al*, 1999; Muzammil *et al*, 2000). A análise dos resultados, apresentados na tabela 6, indica que não ocorreram variações significativas para os parâmetros calculados para o primeiro estado de transição, embora o $\Delta\Delta G^0$ determinado para a proteína E360K ($2,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$) seja ligeiramente superior ao do calculado para a forma C29S. Relativamente ao segundo estado de transição observaram-se variações mais acentuadas, apresentando ambas as enzimas mutadas, valores de $\Delta\Delta G^0$ negativos. Estes dados indicam que as proteínas quiméricas em estudo apresentam para o segundo estado de transição uma estabilidade termodinâmica inferior à proteína selvagem, possivelmente devido a uma estrutura desnaturada menos compacta (m menor).

Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos das proteínas recombinantes 6xHis-hPAH wt, C29S e E360K

	1º estado de transição				2º estado de transição			
	C_m (M)	ΔG^0 (kJ.mol ⁻¹)	m (kJ.L.mol ⁻²)	$\Delta\Delta G^0$	C_m (M)	ΔG^0 (kJ.mol ⁻¹)	m (kJ.L.mol ⁻²)	$\Delta\Delta G^0$
6xHis-hPAHwt	2,1	13,7	6,6	-	4,9	39,0	8,1	-
C29S	1,8	13,8	7,6	+ 0,1	5,8	23,3	1,5	- 15,7
E360K	2,2	16,3	7,5	+ 2,6	5,2	24,8	4,7	- 14,2

C_m representa a concentração de ureia necessária para desnaturar metade das moléculas de proteína; ΔG^0 representa a variação de energia livre entre os dois estados na ausência de desnaturante; m é um parâmetro indicativo do número de aminoácidos acessíveis ao solvente durante o processo de desnaturação; $\Delta\Delta G^0$ representa a diferença entre os ΔG^0 determinados para cada estado de transição relativamente à forma selvagem.

2.10. Estabilidade das enzimas C29S e E360K ao longo do tempo de armazenamento

Uma vez que foi demonstrado (Parte III, capítulo I) que é possível armazenar a proteína 6xHis-hPAHwt em solução, desde que sejam seleccionados agentes estabilizantes, foi testado a estabilidade das proteínas quiméricas C29S e E360K durante um mês de armazenamento, a -20°C na presença de glicerol a 50% ou de manitol a 10%.

Os dados, apresentados na figura 9, indicam que na presença de glicerol a 50% ambas as proteínas quiméricas são mais resistentes à perda de actividade ao longo do tempo de armazenamento, quando comparadas com a forma selvagem. Utilizando este agente estabilizante a C29S manteve cerca de 76% de actividade ao fim de 30 dias de armazenamento a -20°C, enquanto que a E360K manteve cerca de 81%. Em manitol a 10% a proteína E360K tem um comportamento semelhante ao da 6xHis-hPAHwt, mantendo cerca de 70% da actividade inicial, mas proteína C29S apresenta um valor de actividade enzimática mais elevado, de cerca de 87%.

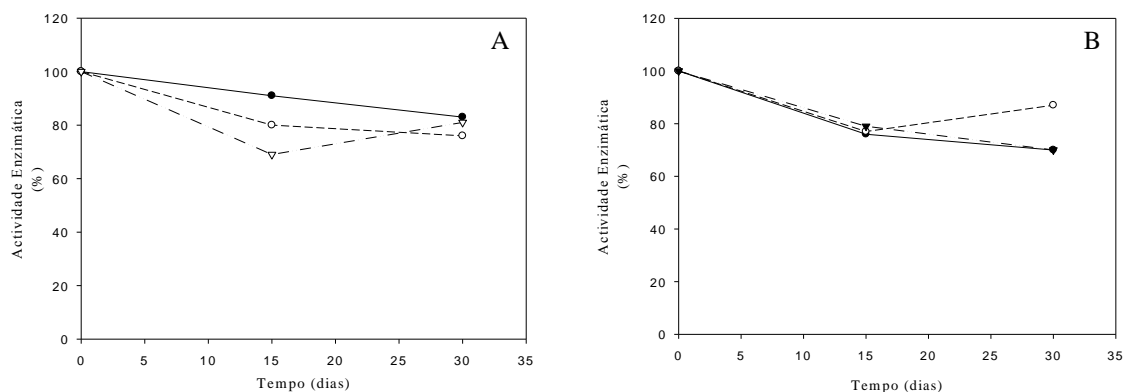


Figura 10 – Actividade enzimática das diferentes formas recombinantes da 6xHis-hPAH ao longo do tempo de armazenamento a -20°C , em 50% de glicerol (A) e em 10% de manitol (B). (●—) forma selvagem, (○---) C29S, (▼-·-·) E360K.

3. Discussão

A produção de proteínas quiméricas tem como objectivo “criar” macromoléculas com características funcionais melhoradas. No entanto, a escolha dos aminoácidos a mutagenizar não é aleatória. É necessário efectuar uma análise detalhada da estrutura e propriedades bioquímicas da proteína. Assim, no caso da proteína 6xHis-hPAHwt foram seleccionados sete resíduos de aminoácidos (Cys29, Cys284, Cys445, Asp145, Asp151, Glu181 e Glu360), os quais se encontram representados na figura 11.

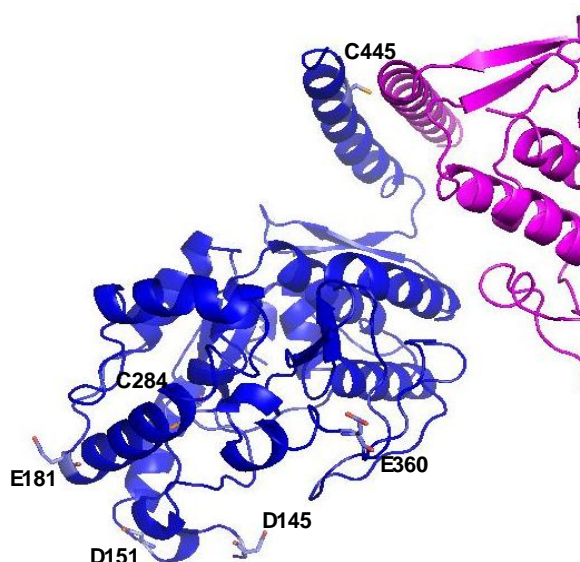


Figura 11 - Localização dos resíduos alvo de mutagenização para produção de proteínas 6xHis-hPAH quiméricas. O azul e o rosa representam duas subunidades proteicas. A figura foi preparada utilizando o programa pymol (Delano Scientific LLC) e a estrutura da forma truncada Δ 1-118 hPAH (pdb 2 PAH)

As substituições efectuadas nos resíduos de Cys (Cys29, Cys284 e Cys245) tiveram como objectivo diminuir a possibilidade de ocorrência de oxidação, fenómeno químico frequente aquando do armazenamento de soluções proteicas e que pode contribuir para a alteração da função biológica da proteína (Wang W, 1999). Adicionalmente foram também alteradas as cargas de resíduos presentes na superfície proteica, mais acessíveis ao solvente. Seleccionaram-se os resíduos Asp145, Asp151, Glu181 e Glu360 uma vez estes resíduos (polares carregados negativamente), para além de não se localizarem na interface monómero-monómero e dímero-dímero (figura 11), apresentam um elevado índice de acessibilidade, quer quando calculado pelo programa NETASA, quer pelo programa CUPSAT (Cologne University Protein Stability Analysis Tool; <http://cupsat.tu-bs.de>; Parthiban V *et al*, 2006) (tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros de acessibilidade ao solvente dos resíduos C29, C284, C445, D145, D151, E181 e E360 da proteína hPAH calculados utilizando os programas NETASA e CUPSAT.

	ASA ⁽¹⁾ (Å)	Categoria do resíduo ⁽¹⁾	Acessibilidade ⁽²⁾ (%)	Número de substituições de aminoácidos que afectam a estabilidade ⁽²⁾		
				Favoráveis	Desfavoráveis	Neutros
Cys29	13,8	i	-	-	-	-
Cys284	3,4	i	0	11	8	-
Cys445	2,6	i	9,97	18	1 (Lys)	-
Asp145	70	e	77,03	15	4	-
Asp151	51	e	31,92	10	9	-
Glu181	110,4	e	71,55	16	3	-
Glu360	107,4	e	114,8	9	9	1 (Arg)

⁽¹⁾Cálculo efectuado pelo programa NETASA utilizando a estrutura primária da hPAH. (ASA) Área superficial acessível ao solvente; (i) resíduos internos; (e) resíduos expostos.

⁽²⁾Cálculo efectuado com o programa CUPSAT utilizando a estrutura 2pah depositada no *Protein Data Bank* (resíduos 118-452).

Relativamente às mutações onde ocorreu a substituição dos resíduos de Cys, foi possível constatar que não só a localização das mutações mas também a substituição efectuada contribuíram para a indução de alterações nas propriedades da proteína. É de realçar que, qualquer dos resíduos alvo de alterações se encontravam no interior da proteína (tabela 7) passando para a superfície proteica na forma quimérica (tabela 8).

Tabela 8 – Parâmetros de acessibilidade ao solvente e estabilidade proteica resultantes das mutações C29S, C29D, C284S, C445S, D145K, D151K, E181K e E360K da proteína hPAH calculados utilizando os programas NETASA e CUPSAT.

	Aumento relativo da actividade ⁽¹⁾	Resíduos afectados ⁽²⁾	Categoria do resíduo introduzido ⁽²⁾	Alteração no valor médio de ASA ⁽²⁾ (Å)	Alteração na estabilidade total $\Delta\Delta G$ ⁽³⁾ (kcal.mol ⁻¹)
C29D	1,5	7	E	+ 23,5	-
C29S	2,8	7	E	+ 15,9	-
C284S	3,5	7	E	+ 7,01	2,37
C445S	3,4	7	E	+ 3,8	1,6
D145K	1,8	7	E	+ 6,14	0,45
D151K	0,32	7	E	+ 4,21	2,74
E181K	1,3	7	E	+ 4,77	- 0,32
E360K	1,8	7	E	+ 2,99	- 0,52

⁽¹⁾ Calculado considerando como referência a actividade enzimática da 6xHis-hPAHwt.

⁽²⁾ Cálculo efectuado pelo programa NETASA utilizando a estrutura primária da hPAH. (ASA) Área superficial acessível ao solvente; (e) resíduos expostos.

⁽³⁾ Cálculo efectuado com o programa CUPSAT utilizando a estrutura 2pah depositada no *Protein Data Bank* (resíduos 118-452).

O resíduo Cys29 localiza-se na sequência auto-reguladora (ARS) que compreende os resíduos 1 a 30/31, mais concretamente no *loop* Asp27-Gly33. Este loop localiza-se na interface do núcleo do domínio regulador (resíduos 30/31 a 117/118) e da ARS N-terminal. No resíduo Cys29 efectuámos dois tipos de alterações: (1) introdução de um aminoácido carregado negativamente (C29D); (2) substituição da Cys por um aminoácido com características semelhantes em termos de carga e de massa (C29S). Embora ambas as mutações efectuadas neste resíduo tenham originado uma proteína com maior actividade, o efeito foi mais marcado para a alteração C→S do que C→D. Este facto pode estar relacionado com a introdução de uma carga negativa num resíduo que não se encontrava exposto ao solvente, induzindo alterações estruturais que resultam numa maior actividade enzimática. Os dados obtidos para a proteína C29S foram surpreendentes uma vez que a substituição de um resíduo de aminoácido não carregado, por outro com características idênticas deveria conduzir à obtenção de uma proteína com actividade enzimática semelhante mas mais “resistente” aos fenómenos químicos (oxidação) que podem ocorrer durante o armazenamento. No entanto esta proteína apresenta uma actividade enzimática 2,8 vezes superior à da forma selvagem, bem como uma maior eficiência catalítica (1,2 e 0,29 $\mu\text{M}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para as proteínas C29S e selvagem, respectivamente), essencialmente devido ao aumento da afinidade para o substrato. Estruturalmente esta proteína não parece apresentar alterações muito significativas como comprovado pelo perfil de resistência à proteólise e o valor do T_m calculado (52°C), resultados muito semelhantes aos da forma selvagem. Quando

conservada em manitol a 10%, durante um mês, a -20°C , a proteína C29S tem uma maior capacidade de manutenção da sua actividade do que a 6xHis-hPAHwt. Este resultado poderá estar directamente relacionado com uma menor susceptibilidade à oxidação, neste agente estabilizante, ou pela possível diminuição do processo de desamidação não-enzimática dos resíduos de Asn adjacentes ao resíduo Cys29, nomeadamente o resíduo Asn32 (Carvalho R *et al*, 2003).

O resíduo Cys284 localiza-se no centro activo, no início da hélice- $\alpha 8$, imediatamente antes do resíduo His285 (figura 12) necessário para a ligação do ferro à enzima (Gibbs BS *et al*, 1993). O aminoácido 284 faz também parte dos dez aminoácidos que se encontram no centro activo e estabelecem a ligação ao cofactor (Jennings IG *et al*, 1991). Mais especificamente, este resíduo localiza-se no final da região de ligação ao cofactor (CBR 2; resíduos 280-283). Foi demonstrado, por Andersen e colaboradores, que mutações nesta zona induzem alterações profundas na conformação da proteína e na ligação ao cofactor BH_4 , sendo necessárias concentrações mais elevadas de cofactor para obter uma resposta catalítica (Andersen OA *et al*, 2002). Embora, para a proteína C284S não tenha sido avaliada a sua capacidade de ligação ao cofactor, esta forma não apresentou uma diminuição da capacidade de hidroxilação da L-Phe mas sim um aumento bastante significativo (3,5 vezes). Esta mutação poderá conduzir a alterações na conformação da proteína uma vez que foi observado uma maior percentagem de formas diméricas e um T_m de $47,5^{\circ}\text{C}$, valor inferior ao da forma selvagem (52°C).

A mutação C445S foi efectuada na hélice- $\alpha 16$ (figura 12) pertencente ao domínio de tetramerização. Embora esteja previsto que a alteração introduzida resulte numa proteína mais estável (tabela 8), o perfil de oligomerização obtido indica que a proteína C445S se encontra maioritariamente na forma dimérica (99%). Deste modo, como seria de esperar, esta mutação irá interferir com o *assembly* da proteína em tetrâmeros. Uma vez que os níveis de actividade enzimática obtidos são bastante elevados (3,4 vezes superior à da 6xHis-hPAHwtwt), esta proteína poderá apresentar alterações conformacionais que tornem o centro activo mais acessível ao substrato mas que simultaneamente impossibilitem a formação de tetrâmeros.

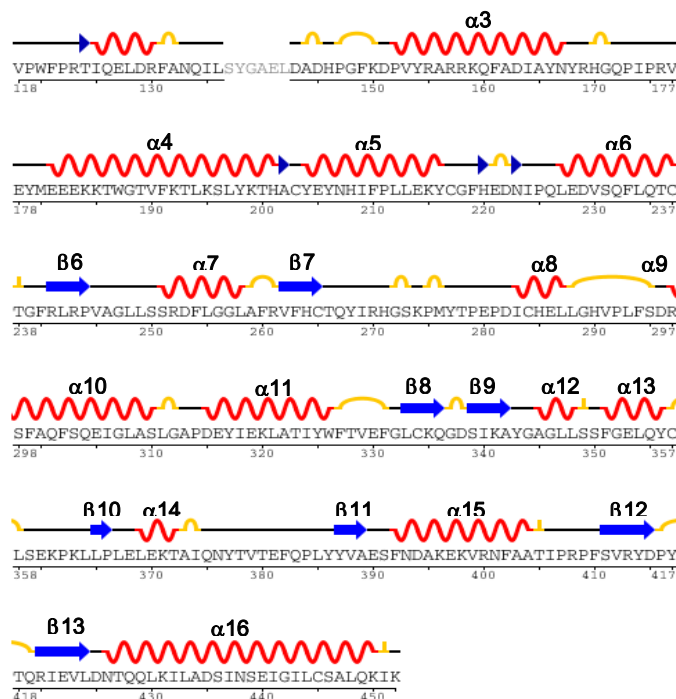


Figura 12 – Representação da estrutura secundária da forma truncada Δ 1-118 hPAH (pdb 2PAH). Retirado de RCSB Protein Data Bank: (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Com a substituição de aminoácidos polares carregado negativamente (Asp ou Glu) por um resíduo polar carregado positivamente (Lys) pretendíamos induzir alterações na carga exterior da proteína e assim aumentar a sua estabilidade. Na proteína D145K, introduzimos este tipo de alteração na posição 145. Este resíduo encontra-se localizado num *loop* (figura 12) perto da entrada do centro activo e possivelmente controlará o acesso a este (Erlandsen e Stevens, 1999). Sabe-se que na enzima fosforilada o resíduo Asp145 estabelece uma ligação iónica com o resíduo Arg13 o qual por sua vez interage com a Ser16 fosforilada. Pensa-se que esta interacção seja fundamental para a remoção da zona ARS da entrada do centro activo, quando a enzima se encontra fosforilada. Embora seja provável que na proteína D145K o processo de activação pelo substrato se encontre alterado, esta forma quimérica apresentou um aumento de actividade residual relativamente à forma selvagem.

De entre as proteínas quiméricas “desenhadas” apenas a forma D151K apresentou uma actividade enzimática mais baixa do que a da forma selvagem não obstante o cálculo do valor de $\Delta\Delta G$ indicasse um aumento na sua estabilidade (tabela 8). O resíduo 151 localiza-se no início da hélice- α -3 (figura 12) e pertence a uma importante rede de ligações de H envolvendo os resíduos Pro152 e His271. É de prever

que a alteração da carga deste resíduo quebre aquela rede contribuindo para a destabilização da estrutura proteica.

À semelhança da proteína C29D também a forma E181K não apresentou um incremento da actividade enzimática estatisticamente significativo. O resíduo Asp181 localiza-se no início da hélice- α 4, no domínio catalítico.

O resíduo Glu360 localiza-se no domínio catalítico, entre a hélice- α 13 e a cadeia- β 10 (figura 12). Esta enzima apresentou um aumento de actividade catalítica cerca de 1,8 vezes superior à da proteína selvagem. Estes resultados são muito interessantes se tivermos em conta que de acordo com o $\Delta\Delta G$ calculado (tabela 8) esta alteração seria desfavorável. Na realidade, o seu valor de T_m inferior à da forma selvagem (48°C) e a menor resistência à proteólise, vão de encontro aos cálculos efectuados pelo programa CUPSAT. Uma hipótese para explicar estes dados será a existência da proteína num estado activado, mais “aberto”, e portanto mais sensível à proteólise e à inactivação térmica. Os valores determinados para a pré-activação pelo substrato, coeficiente de Hill e $S_{0,5}$ -L-Phe, corroboram esta hipótese. A introdução de um aminoácido carregado positivamente, nesta região da proteína, poderá induzir um deslocamento do domínio regulador, o qual deixaria de cobrir o domínio catalítico aumentando a actividade enzimática e conduzindo a um aumento da sua eficiência catalítica.

IV. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

IV. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho apresentava como objectivo primário a obtenção de formas estáveis da fenilalanina hidroxilase humana utilizando três abordagens diferentes: (1) estabilização *in vitro* da forma selvagem (Capítulo I); (2) estabilização *in vivo* de formas causadoras de doença (Capítulo II) e (3) produção de formas quiméricas mais estáveis (Capítulo III).

Os estudos de estabilidade *in vitro* da proteína 6xHis-hPAHwt (Capítulo I) conduziram à identificação de um conjunto de compostos que permitem manter a actividade enzimática desta proteína quando armazenada em solução, durante um mês, a -20°C. De entre os compostos testados salientaram-se os polióis glicerol e manitol e os dissacáridos sacarose e trealose. O glicerol revelou-se particularmente eficaz uma vez na sua presença a proteína recombinante mantinha o seu perfil de oligomerização e a activação pelo substrato L-Phe tão necessária à sua acção fisiológica. De modo a poder esclarecer o efeito estrutural destes compostos pensamos num futuro próximo proceder à caracterização da estrutura secundária (ex: far-UV CD), da estrutura terciária (ex: *Dynamic Light Scattering*) e seu perfil de estabilidade (ex: *Differential Scanning Calorimetry*). É também importante investigar a ocorrência de reacções de desamidação não-enzimática e de oxidação, uma vez que estes fenómenos podem causar, não a degradação proteica, mas sim uma diminuição da funcionalidade proteica durante o processo de armazenamento (Wang W, 1999). Mais uma vez os ensaios efectuados demonstraram que a fenilalanina hidroxilase é uma proteína que existe num equilíbrio estrutural muito instável, facilmente alterado, tendo como resultado final a formação de agregados. Durante este trabalho foi possível constatar que a presença de agregados solúveis é acompanhada frequentemente pela presença de formas hexaméricas/octaméricas. Podemos postular que estas formas representam a via para a formação de agregados. Sendo assim seria muito importante isolar estas formas (ex: SEC) e proceder a uma caracterização enzimática e biofísica mais detalhada.

Embora a proteína hPAH possa ser considerada uma proteína instável, surpreendentemente foi possível recuperar a sua actividade após liofilização (Capítulo I). No entanto, este resultado só é atingido se a proteína for liofilizada na presença de compostos específicos. Curiosamente, neste processo os agentes mais eficazes na manutenção da capacidade catalítica da 6xHis-hPAHwt foram a sacarose e a trealose. A

proteína liofilizada na presença de trealose existe apenas numa forma tetramérica e não sofre desamidação não-enzimática após um mês de armazenamento a 4°C. No entanto é necessário proceder à caracterização estrutural desta proteína, uma vez que frequentemente e, após liofilização são observadas alterações da sua estrutura secundária (Wang W, 2000).

Face aos resultados tão encorajadores obtidos com a utilização de trealose no processo de liofilização, pensamos agora aprofundar os ensaios de estabilidade em solução, utilizando este agente adjuvante.

A obtenção da estrutura dos cristais da forma *full-length* da hPAH, é uma tarefa difícil, permanecendo um dos maiores desafios na investigação da PAH. O insucesso na identificação de cristais adequados que difractem com uma resolução elevada parece ter como causa a heterogeneidade oligomérica (presença de dímeros e tetrâmeros) da enzima pura e a microheterogeneidade observada resultante da desamidação parcial de resíduos de asparagina, particularmente da Asn32 e Asn376. A obtenção de uma proteína estável, essencialmente na forma tetramérica, após liofilização na presença de trealose (Capítulo I), parece ser a via para ultrapassar a heterogeneidade conformacional descrita e obter cristais da forma *full-length*. A obtenção da estrutura 3D da hPAH contribuirá para completar a sua caracterização estrutural e funcional, nomeadamente no que diz respeito à estrutura do sítio activo, identificação dos resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise e na regulação enzimática, ligação do substrato e inibidores, assim como da base molecular da PKU. Adicionalmente os resultados obtidos no Capítulo I são fundamentais para se estabelecerem as condições experimentais que conduzam a uma possível formulação da PAH recombinante e que abriria as portas para o desenvolvimento da terapia enzimática de reposição para tratamento da PKU.

A caracterização de proteínas hPAH causadoras de doença permitiu constatar que é possível modular a actividade das proteínas mutantes desde que estas sejam sintetizadas, *in vivo*, na presença de chaperones químicos (Capítulo II). De entre os agentes testados, o glicerol, TMAO e taurina induziram um aumento na actividade enzimática e uma diminuição das formas agregadas. No entanto, é difícil prever a resposta das formas mutantes uma vez que, segundo os nossos resultados esta será mutação-específica e agente-específica. Uma vez que o glicerol apresentava um efeito mais “universal” as formas tetraméricas das proteínas mutantes em estudo, produzidas na presença daquele agente, foram caracterizadas estruturalmente. Assim, a presença de glicerol aquando da síntese da cadeia polipeptídica mutada parece induzir um estado

mais estruturado que se aproxima da forma selvagem, que designámos por estado intermédio. Torna-se agora necessário determinar as propriedades cinéticas destas formas estabilizadas bem como caracterizar estruturalmente as formas tetraméricas resultantes da estabilização pelo TMAO e taurina. Estes resultados são extremamente importantes uma vez que, tendo demonstrado que é possível estabilizar *in vivo* proteínas estruturalmente afectadas, abre-se uma porta para a pesquisa de compostos que possam actuar como chaperones farmacológicos. Apesar de os compostos testados não permitirem a recuperação da totalidade da actividade enzimática eles poderão ser encarados como possíveis adjuvantes da terapia dietética.

Até à data apenas uma forma mutante da hPAH tinha sido descrita como apresentado um aumento na sua actividade (Thórólfsson M *et al*, 2002). No decurso deste trabalho demonstrámos que apesar de a hPAH ser uma proteína instável, muito sensível a qualquer tipo de alteração em toda a sua sequência foi possível produzir formas mutantes com maior actividade do que a forma selvagem (Capítulo III). De entre as oito formas quiméricas produzidas, duas não apresentam aumentos de actividade estatisticamente significativos (C29D e E181K) e apenas uma possuía uma actividade enzimática menor do que a forma selvagem (D151K). Como seria de esperar, para estes resultados contribuiu não só a localização dos resíduos mutagenizados mas também o tipo de substituição efectuada. De entre as proteínas que apresentaram um aumento significativo salientamos a proteína C29S, a E360K e a C445S. As duas primeiras porque são formas mutantes com maior actividade mas simultaneamente com uma maior eficiência catalítica que parecem resistir ao armazenamento em solução, durante um mês, a -20°C, na presença dos polióis testados no Capítulo I. Deste modo poderão também ser consideradas como uma possível alternativa a uma formulação proteica. Seria, no entanto interessante investigar se a substituição efectuada no resíduo 29 (C→S) previne possíveis reacções de oxidação. Adicionalmente dever-se-ia também proceder a uma caracterização bioquímica e biofísica detalhada destas formas quiméricas. A forma C445S é particularmente interessante, uma vez que existe maioritariamente na forma de dímeros, resistentes à passagem a tetrâmeros após activação pela L-Phe. À semelhança do mencionado anteriormente, relativamente à obtenção de tetrâmeros estáveis, também a produção de dímeros estáveis poderia conduzir à obtenção de cristais destas formas oligoméricas.

No seu conjunto o trabalho desenvolvido nesta tese oferece-nos diferentes perspectivas de estabilização da proteína hPAH, *in vivo* e *in vitro*, sendo o espelho das potencialidades da engenharia proteica como processo de estabilização de proteínas intrinsecamente instáveis. Finalmente, os conhecimentos adquiridos poderão futuramente conduzir ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tratamento, não só da PKU mas de outras doenças conformacionais.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta PB, Trahms C, Wellman NS, Williamson M (1983). Phenylalanine intakes of 1- to 6-year-old children with phenylketonuria undergoing therapy. *Am J Clin Nutr*. 1983 Nov;38(5):694-700.
- Agrawal HC, Bone AH, Davison AN (1970). Effect of phenylalanine on protein synthesis in the developing rat brain. *Biochem J*, 117(2):325-31.
- Ahmad S, Gromiha MM (2002), NETASA: neural network based prediction of solvent accessibility, *Bioinformatics*, 18(6):819-24.
- Andersen OA, Flatmark T, Hough E (2001). High resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase in its catalytically active Fe(II) form and binary complex with tetrahydrobiopterin. *J Mol Biol*, 314(2):279-91.
- Andersen OA, Flatmark T, Hough E (2002). Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J Mol Biol*, 320(5):1095-108.
- Andersen OA, Stokka AJ, Flatmark T, Hough E (2003). 2.0Å resolution crystal structures of the ternary complexes of human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine or L-norleucine: substrate specificity and molecular motions related to substrate binding. *J Mol Biol*, 333(4):747-57.
- Asay DB, Kim SH (2006). Effects of adsorbed water layer structure on adhesion force of silicon oxide nanoasperity contact in humid ambient. *J Chem Phys*, 124(17):174712.
- Asay Y (2006). Cryoprotective effects of saccharides on the freeze-drying of sonicated vesicles of the novel lipid A analog, E5531. *Pharm Dev Technol*, 11(2): 229-33.
- Bartholomé K (1975). Letter: A new molecular defect in phenylketonuria. *Lancet*, 2(7896):1580.
- Bassan A, Blomberg MR, Siegbahn PE (2003). Mechanism of aromatic hydroxylation by an activated FeIV=O core in tetrahydrobiopterin-dependent hydroxylases. *Chemistry*, 9(17):4055-67.
- Bénit P, Rey F, Blandin-Savoja F, Munnich A, Abadie V, Rey J (1999). The mutant genotype is the main determinant of the metabolic phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab*, 68(1):43-7.
- Bénit P, Rey F, Munnich A, Rey J. To Consortium, 26/08/97
- Benkovic S, Wallick D, Bloom L, Gaffney BJ, Domanico P, Dix T, Pember S (1985). On the mechanism of action of phenylalanine hydroxylase. *Biochem Soc Trans*, (2):436-8.

Bick U, Fahrenndorf G, Ludolph AC, Vassallo P, Weglage J, Ullrich K (1991). Disturbed myelination in patients with treated hyperphenylalaninaemia: evaluation with magnetic resonance imaging. *Eur J Pediatr*, 150(3):185-9.

Björgo E, de Carvalho RM, Flatmark T (2001). A comparison of kinetic and regulatory properties of the tetrameric and dimeric forms of wild-type and Thr427-->Pro mutant human phenylalanine hydroxylase: contribution of the flexible hinge region Asp425-Gln429 to the tetramerization and cooperative substrate binding. *Eur J Biochem*, 268(4):997-1005.

Björgo E, Knappskog PM, Martinez A, Stevens RC, Flatmark T (1998). Partial characterization and three-dimensional-structural localization of eight mutations in exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene associated with phenylketonuria. *Eur J Biochem*, 257(1):1-10.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-54.

Burlina AB, Ogier H, Korall H, Trefz FK (2001). Long-term treatment with sodium phenylbutyrate in ornithine transcarbamylase-deficient patients. *Mol Genet Metab*, 72(4):351-5.

Burrows JA, Willis LK, Perlmutter DH (2000). Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc Natl Acad Sci*, 15;97(4):1796-801.

Carvalho RN, Solstad T, Björgo E, Barroso JF, Flatmark T (2003). Deamidations in recombinant human phenylalanine hydroxylase. Identification of labile asparagine residues and functional characterization of Asn --> Asp mutant forms. *J Biol Chem*, 278(17):15142-52.

Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A (1989). Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(8):2617-21.

Cleland JL, Powell MF, Shire SJ (1993). The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 10(4):307-77.

Costas M, Mehn MP, Jensen MP, Que L (2004). Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev*, 104(2):939-86.

Coutinho A, Prieto M (2003). Cooperative partition model of nystatin interaction with phospholipid vesicles. *Biophys J*, 84(5):3061-78.

Crowe LM, Crowe JH (1992). Stabilization of dry liposomes by carbohydrates. *Dev Biol Stand*, 74:285-94.

Crowe LM, Reid DS, Crowe JH (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J*, 71(4):2087-93.

Dahl HH, Mercer JF (1986). Isolation and sequence of a cDNA clone which contains the complete coding region of rat phenylalanine hydroxylase. Structural homology with tyrosine hydroxylase, glucocorticoid regulation, and use of alternate polyadenylation sites. *J Biol Chem*, 261(9):4148-53.

Devi KS, Devi AR, Kondaiah P (1998). Amplification of phenylalanine hydroxylase and cystathionine beta-synthase transcripts in human peripheral lymphocytes by RT-PCR. *Biochem Mol Biol Int*, 45(4):643-50.

DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J, Woo SL (1986). Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry*, 25(4):743-9.

Ding Z, Harding CO, Thöny B (2004). State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab*, 81: 3-8.

Dix TA, Benkovic SJ (1985). Mechanism of "uncoupled" tetrahydropterin oxidation by phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry*, 24(21):5839-46.

Dix TA, Bollag GE, Domanico PL, Benkovic SJ (1985). Phenylalanine hydroxylase: absolute configuration and source of oxygen of the 4a-hydroxytetrahydropterin species. *Biochemistry*, 24(12):2955-8.

Døskeland A, Ljones T, Skotland T, Flatmark T (1982). Phenylalanine 4-monooxygenase from bovine and rat liver: some physical and chemical properties. *Neurochem Res*, 7(4):407-21.

Døskeland AP, Martinez A, Knappskog PM, Flatmark T (1996). Phosphorylation of recombinant human phenylalanine hydroxylase: effect on catalytic activity, substrate activation and protection against non-specific cleavage of the fusion protein by restriction protease. *Biochem J*, 313:409-14.

Eiken HG, Knappskog PM, Boman H, Thune KS, Kaada G, Motzfeldt K, Apold J (1996). Relative Frequency, Heterogeneity, and Geographic Clustering of PKU Mutations in Norway. *Eur J Hum Genet*, 4: 205-213.

Eisensmith RC, Martinez DR, Kuzmin AI, Goltsov AA, Brown A, Singh R, Elsas LJ II, Woo SL (1996). Molecular basis of phenylketonuria and a correlation between genotype and phenotype in a heterogeneous southeastern US population. *Pediatrics*, 97(4):512-6.

Eisensmith RC, Woo SL (1991). Phenylketonuria and the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Biol Med*, 8(1):3-18.

Ekstrom F, Akfur C, Tunemalm AK, Lundberg S (2006). Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 45(1):74-81.

Ellingsen S, Knappskog PM, Apold J, Eiken HG (1999). Diverse PAH transcripts in lymphocytes of PKU patients with putative nonsense (G272X, Y356X) and missense (P281L, R408Q) mutations. *FEBS Lett*, 457(3):505-8.

Erlandsen H, Bjørge E, Flatmark T, Stevens RC (2000). Crystal structure and site-specific mutagenesis of pterin-bound human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry*, 39(9):2208-17.

Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC, Hough E (1998). Crystallographic analysis of the human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with bound catechol inhibitors at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, 37(45):15638-46.

Erlandsen H, Martinez A, Knappskog PM, Haavik J, Hough E, Flatmark T (1997). Crystallization and preliminary diffraction analysis of a truncated homodimer of human phenylalanine hydroxylase. *FEBS Lett*, (1-2):171-4.

Erlandsen H, Pey AL, Gámez A, Pérez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Surendran S, Tying S, Matalon R, Scriver CR, Ugarte M, Martínez A, Stevens RC (2004). Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(48):16903-8.

Erlandsen H, Stevens RC (1999). The structural basis of phenylketonuria. *Mol Gen Met*, 68: 103-125.

Flatmark T, Stevens RC (1999). Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms. *Chem Rev*, 99(8):2137-2160.

Fölling A (1934). Über Ausscheidung von phenylbrenztraubensäure in den harn als stoffwechselanomalie in verbindung mit imbezillitat. *Hoppe-Seylers Z Physio Chem*, 277: 169-176.

Fox KC (1995). Biopreservation. Putting proteins under glass. *Science*, 12;268(5212):788.

Frieden C (1970). Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept. *J Biol Chem*, 245(21):5788-99.

Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC (1998). Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem*, 273(27):16962-7.

Gámez A, Wang L, Straub M, Patch MG, Stevens RC (2004). Toward PKU enzyme replacement therapy: PEGylation with activity retention for three forms of recombinant phenylalanine hydroxylase. *Mol Ther*, 9(1):124-9.

Gardian G, Browne SE, Choi DK, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, Ryu H, Langley B, Ratan RR, Ferrante RJ, Beal MF (2005). Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease, *J Biol Chem*, 280(1):556-63.

Gibbs BS, Wojchowski D, Benkovic SJ (1993). Expression of rat liver phenylalanine hydroxylase in insect cells and site-directed mutagenesis of putative non-heme iron-binding sites. *J Biol Chem*, 268(11):8046-52.

Gjetting T, Petersen M, Guldberg P, Guttler F (2001). *In vitro* expression of 34 naturally occurring mutant variants of phenylalanine hydroxylase: correlation with metabolic phenotypes and susceptibility toward protein aggregation. *Molec Genet Metab*, 72: 132-143.

Gjetting T, Petersen M, Guldberg P, Güttler F (2001). Missense mutations in the N-terminal domain of human phenylalanine hydroxylase interfere with binding of regulatory phenylalanine. *Am J Hum Genet*, 68(6):1353-60.

Greene RF, Pace CN (1974). Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin. *J Biol Chem*, 249(17):5388-93.

Grenett HE, Ledley FD, Reed LL, Woo SL (1987). Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(16):5530-4.

Guthrie R, Susi A (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32: 318-343.

Güttler F, Guldberg P (1994). Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene: genetic determinants for the phenotypic variability of hyperphenylalaninemia. *Acta Paediatr Suppl*, 407:49-56.

Hagen SJ, Hofrichter HJ, Bunn HF, Eaton WA (1995). Comments on the physics and chemistry of trehalose as a storage medium for hemoglobin-based blood substitutes: "from Kramers Theory to the Battlefield". *Transfus Clin Biol*, 2(6):423-6

Hagen SJ, Hofrichter J, Szabo A, Eaton WA (1996). Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome c: estimating the maximum rate of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(21):11615-7.

Hellman K, Miller DS, Cammack KA (1983). The effect of freeze-drying on the quaternary structure of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biochim Biophys Acta*, (2):133-42.

Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG (1995). Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J*, 311 (Pt 2):353-66

Huften SE, Jennings IG, Cotton RG (1998). Structure/function analysis of the domains required for the multimerisation of phenylalanine hydroxylase. *Biochim Biophys Acta*, ;1382(2):295-304.

Huttenlocher PR (2000). The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr*, 159 Suppl 2:S102-6.

Jennings IG, Kemp BE, Cotton RG (1991). Localization of cofactor binding sites with monoclonal anti-idiotypic antibodies: phenylalanine hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(13):5734-8.

John SW, Scriver CR, Laframboise R, Rozen R (1992). *In vitro* and *in vivo* correlations for I65T and M1V mutations at the phenylalanine hydroxylase locus. *Hum Mutat*, 1(2):147-53.

Ju J, Misono H, Ohnishi K (2005). Directed evolution of bacterial alanine racemases with higher expression level. *J Biosci Bioeng*, 100(3):246-54.

Kanai Y, Endou H (2003). Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J Toxicol Sci*, 28(1):1-17.

Kappock TJ, Caradonna JP (1996). Pterin-Dependent Amino Acid Hydroxylases. *Chem Rev*, 96(7):2659-2756.

Kappock TJ, Harkins PC, FriedenberG S, Caradonna JP (1995). Spectroscopic and kinetic properties of unphosphorylated rat hepatic phenylalanine hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. Comparison of resting and activated states. *J Biol Chem*, 270(51):30532-44.

Kaufman S (1987). Phenylalanine 4-monooxygenase from rat liver. *Methods Enzymol*, 142:3-17.

Kaushik JK, Bhat R (2003). Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem*, 278(29):26458-65.

Kerruish NJ, Robertson SP (2005). Newborn screening: new developments, new dilemmas. *J Med Ethics*, 31:393-398.

Kleiman S, Vanagaite L, Bernstein J, Schwartz G, Brand N, Elitzur A, Woo SLC, Shiloh Y (1993). Phenylketonuria: variable phenotypic outcomes of the R261Q mutation and maternal PKU in the offspring of a healthy homozygote. *J Med Genet*, 30:284-288.

Kleppe R, Uhlemann K, Knappskog PM, Haavik J (1999). Urea-induced denaturation of human phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem*, 274(47):33251-8.

Knappskog M, Eiken HG, Martinez A, Olafsdotti S, Haavik J, Flatmark T, Apold J (1993). Expression of wild type and mutant forms of human phenylalanine hydroxylase in *E. coli*. *Adv Exp Med Biol*, 338:59-62.

Knappskog PM, Eiken HG, Martinez A, Olafsdottir S, Haavik J, Flatmark T, Apold J. Expression of wild type and mutant forms of human phenylalanine hydroxylase in *E. Coli*. In: *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*. edited by AYLING EE, New York, Pl.

Knappskog PM, Flatmark T, Aarden JM, Haavik J, Martínez A (1996). Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. *Eur J Biochem*, 242(3):813-21.

Knappskog PM, Haavik J (1995). Tryptophan fluorescence of human phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 34(37):11790-9.

Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD, Stevens RC, Cotton RG, Kemp BE (1999). Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol*, 6(5):442-8.

Konecki DS, Wang Y, Trefz FK, Lichter-Konecki U, Woo SL (1992). Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry*, 31(35):8363-8.

Koshland DE, Hamadani K (2002). Proteomics and models for enzyme cooperativity. *J Biol Chem*, 277(49):46841-4.

Kowlessur D, Citron BA, Kaufman S (1996). Recombinant human phenylalanine hydroxylase: novel regulatory and structural properties. *Arch Biochem Biophys*, 333(1):85-95.

Kubota K, Niinuma Y, Kaneko M, Okuma Y, Sugai M, Omura T, Uesugi M, Uehara T, Hosoi T, Nomura Y (2006). Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem*, 97(5):1259-68.

Kwok SC, Ledley FD, DiLella AG, Robson KJ, Woo SL (1985). Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry*, 24(3):556-61.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-5.

Leandro J, Nascimento C, de Almeida IT, Leandro P (2006). Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation. *Biochim Biophys Acta*, 1762(5):544-50.

Leandro P, Lechner MC, Tavares de Almeida I, Konecki D (2001a). Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant

enzymes produced in a prokaryotic expression system. *Mol Genet Metab*, 73(2):173-8.

Leandro P, Rivera I, Lechner MC, Konecki D, Tavares de Almeida (2001b). Prokaryotic expression analysis of I269L and R270K mutations of the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) gene. *Gene Function Disease*, 1:46-50.

Leandro P, Rivera I, Lechner MC, de Almeida IT, Konecki D (2000). The V388M mutation results in a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase. *Mol Genet Metab*, (3):204-12.

Ledley FD, DiLella AG, Kwok SC, Woo SL (1985). Homology between phenylalanine and tyrosine hydroxylases reveals common structural and functional domains. *Biochemistry*, 24(14):3389-94.

Ledley FD, Grenett HE, Woo SL (1987). Biochemical characterization of recombinant human phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 262(5):2228-33.

Lee JC, Timasheff SN (1974). The calculation of partial specific volumes of proteins in guanidine hydrochloride. *Arch Biochem Biophys*, 165(1):268-73.

Lehrer SS (1971). Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry*, 10(17):3254-63.

Levy HL, Ghavami M (1996). Maternal phenylketonuria: a metabolic teratogen. *Teratology*, 53(3):176-84.

Li S, Patapoff TW, Nguyen TH, Borchardt RT (1996). Inhibitory effect of sugars and polyols on the metal-catalyzed oxidation of human relaxin. *J Pharm Sci*, 85(8):868-72.

Li S, Patapoff TW, Overcashier D, Hsu C, Nguyen TH, Borchardt RT (1996). Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state. *J Pharm Sci*, 85(8):873-7.

Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS (1999b). Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab*, 67(4):308-16.

Lichter-Konecki U, Moter SE, Krawisz BR, Schlotter M, Hipke C, Konecki DS (1999a). Expression patterns of murine lysosome-associated membrane protein 2 (Lamp-2) transcripts during morphogenesis. *Differentiation*, 65(1):43-58.

Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, Woo SL (1985a). Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. 1: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(18):6221-5.

Lidsky AS, Ledley FD, DiLella AG, Kwok SC, Daiger SP, Robson KJ, Woo SL (1985b). Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Am J Hum Genet*, 37(4):619-34.

Lou HC, Toft PB, Andresen J, Mikkelsen I, Olsen B, Güttler F, Wieslander S, Henriksen O (1992). An occipito-temporal syndrome in adolescents with optimally controlled hyperphenylalaninaemia. *J Inherit Metab Dis*, 15(5):687-95.

Martinez A, Knappskog PM, Olafsdottir S, Døskeland AP, Eiken HG, Svebak RM, Bozzini M, Apold J, Flatmark T (1995). Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem J*, 306 (Pt 2):589-97.

Matsuura T, Yomo T (2006). *In vitro* evolution of proteins. *J Biosci Bioeng*, 101(6):449-56.

Miranda FF, Teigen K, Thórólfsson M, Svebak RM, Knappskog PM, Flatmark T, Martínez A (2002). Phosphorylation and mutations of Ser(16) in human phenylalanine hydroxylase. Kinetic and structural effects. *J Biol Chem*, 277:40937-43. *Mol Genet Metab*, 69(2):101-10.

Müllbacher A, Bellett AJ, Hla RT (1989). The murine cellular immune response to adenovirus type 5. *Immunol Cell Biol*, 67 (Pt 1):31-9.

Muzammil S, Kumar Y, Tayyab S (2000). Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation. *Proteins*, 40(1):29-38.

Nakamura A, Takakura Y, Kobayashi H, Hoshino T (2005). *In vivo* directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. *J Biosci Bioeng*, 100: 158–163. *Nat Biotechnol*, 14(10):1283-7.

Ni J, Sasaki Y, Tokuyama S, Sogabe A, Tahara Y (2002). Conversion of a typical catalase from *Bacillus sp* TE124 to a catalase-peroxidase by directed evolution. *J Biosci Bioeng*, 93(1):31-6.

Ogino H, Ishikawa H (2001). Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J Biosci Bioeng*, 91(2):109-16.

Okano Y, Eisensmith RC, Güttler F, Lichter-Konecki U, Konecki DS, Trefz FK, Dasovich M, Wang T, Henriksen K, Lou H et al (1991). Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med*, 324(18):1232-8.

Pace CN (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol*, 131:266-80.

Parthiban V, Gromiha MM, Schomburg D (2006).CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Res*, 34(Web Server issue):W239-42.

Pearsen KD, Gean-Marton AD, Levy HL, Davis KR (1990). Phenylketonuria: MR imaging of the brain with clinical correlation. *Radiology*, 177(2):437-40.

Peek LJ, Brandau DT, Jones LS, Joshi SB, Middaugh CR (2006). Effects of stabilizers on the destabilization of proteins upon adsorption to aluminum salt adjuvants. *J Pharm Sci*, 24(31-32):5839-51.

Perlmutter DH (2002). Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr Res*, 52(6):832-6.

Petruschka L, Rebrin I, Grimm U, Herrmann FH (1990). The immunological evidence for a phenylalanine hydroxylase like immunoreactive protein in different human cells and tissues. *Clin Chim Acta*,193(1-2):65-77.

Pey AL, Martinez A (2005). The activity of wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase and its regulation by phenylalanine and tetrahydrobiopterin at physiological and pathological concentrations: an isothermal titration calorimetry study. *Mol Genet Metab*, 86 Suppl 1:S43-53.

Pey AL, Desviat LR, Gamez A, Ugarte M, Perez B (2003). Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat*, 21(4):370-8.

Phillips RS, Iwaki M, Kaufman S (1983). Ligand effects on the limited proteolysis of phenylalanine hydroxylase: evidence for multiple conformational states. *Biochem Biophys Res Commun*, 110(3):919-25.

Phillips RS e Kaufman S (1984). Ligand effects on the phosphorylation state of hepatic phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem*, 259(4):2474-9.

Powell MF (1996). Drug delivery issues in vaccine development. *Pharm Res*, 13(12):1777-85.

Proudfoot NJ, Brownlee GG (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 263(5574):211-4.

Rivera I, Cabral A, Almeida M, Leandro P, Carmona C, Eusébio F, Tasso T, Vilarinho L, Martins E, Lechner MC, de Almeida IT, Konecki DS, Lichter-Konecki U (2000). The correlation of genotype and phenotype in Portuguese hyperphenylalaninemic patients. *Mol Genet Metab*, 69(3):195-203.

Roser B (1991) *et al.* Drying: a novel replacement for freeze-drying” *Biopharm*. 4(9): 47-53 (1991).

Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL (1997). In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest*, 100(10):2457-65.

- Rubenstein RC, Zeitlin PL (1998). A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(2):484-90.
- Rupley JA, Careri G (1991). Protein hydration and function. *Adv Protein Chem*, :37-172.
- Sarkar G, Sommer SS. Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissue or species specificity. *Science*, 244(4902):331-4.
- Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, Peevers R, Su H, Heft R, Chang TM, Scriver CR (1999). A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):2339-44.
- Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Gütlich M, Lemke KR, Rödl W, Swanson NN, Hitzemann K, Ziegler I (1994). Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science*, (5152):1444-6.
- Scriver CR (1971). Mutants: consumers with special needs. *Nutr Rev*, 29(7):155-8.
- Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC (1995). The hyperphenylalaninemias. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill, pp 1015-1075.
- Scriver CR, Kaufman S. The Hiperphenylalaninemias, in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, D. Valle (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, eight ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp 1667-1724.
- Sharma VK, Kalonia DS (2004). Polyethylene glycol-induced precipitation of interferon alpha-2a followed by vacuum drying: development of a novel process for obtaining a dry, stable powder. *AAPS PharmSci*, 6(1):E4.
- Shiman R, Gray DW (1980). Substrate activation of phenylalanine hydroxylase. A kinetic characterization. *J Biol Chem*, 257: 4793-4800.
- Shortle D (1995). Protein fold recognition. *Nat Struct Biol*, 2(2):91-3.
- Sidhu SS (2000). Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 11: 610-616.
- Singh OV, Vij N, Mogayzel PJ Jr, Jozwik C, Pollard HB, Zeitlin PL (2006). Pharmacoproteomics of 4-phenylbutyrate-treated IB3-1 cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *J Proteome Res*, 5(3):562-71.
- Solstad T, Stokka AJ, Andersen OA, Flatmark T (2003). Studies on the regulatory properties of the pterin cofactor and dopamine bound at the active site of human phenylalanine hydroxylase. *Eur J Biochem*, 270:981-90.

Solstad T, Flatmark T (2000). Microheterogeneity of recombinant human phenylalanine hydroxylase as a result of nonenzymatic deamidations of labile amide containing amino acids. Effects on catalytic and stability properties. *Eur J Biochem*, 267(20):6302-10.

Song JL, Chuang DT (2001). Natural osmolyte trimethylamine N-oxide corrects assembly defects of mutant branched-chain alpha-ketoacid decarboxylase in maple syrup urine disease. *J Biol Chem*, 276(43):40241-6.

Speed MA, Wang DI, King J (1996). Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition.

Speer A, Bollman R, Michel A, Neumann R, Bommer C, Hanke R, Riess O, Cobet G, Coutelle C (1986). Prenatal diagnosis of classical phenylketonuria by linked restriction fragment length polymorphism analysis. *Prenat Diagn*, 6(6):447-50.

Stokka AJ, Carvalho RN, Barroso JF, Flatmark T (2004). Probing the role of crystallographically defined/predicted hinge-bending regions in the substrate-induced global conformational transition and catalytic activation of human phenylalanine hydroxylase by single-site mutagenesis. *J Biol Chem*, (25):26571-80.

Stokka AJ, Flatmark T (2003). Substrate-induced conformational transition in human phenylalanine hydroxylase as studied by surface plasmon resonance analyses: the effect of terminal deletions, substrate analogues and phosphorylation. *Biochem J*, 369(Pt 3):509-18.

Surtees R, Blau N (2000). The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr*, 159 Suppl 2:S109-13.

Tanaka K, Takeda T, Miyajima K (1991). Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase by freeze-drying, *Chem Pharm Bull*. 39(5), 1091-1094.

Tanford C (1970). Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv Protein Chem*, 24:1-95.

Teigen K, Frøystein NA, Martínez A (1999). The structural basis of the recognition of phenylalanine and pterin cofactors by phenylalanine hydroxylase: implications for the catalytic mechanism. *J Mol Biol*, 294(3):807-23.

Thórólfsson M, Ibarra-Molero B, Fojan P, Petersen SB, Sanchez-Ruiz JM, Martínez A (2002). L-phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry*, 41(24):7573-85.

Thórólfsson M, Teigen K, Martínez A (2003). Activation of phenylalanine hydroxylase: effect of substitutions at Arg68 and Cys237. *Biochemistry*, (12):3419-28.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76(9):4350-4

Udenfried S, Cooper JR (1952). The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J Biol Chem*, 194(2):503-11.

Voigt CA, Kauffman S, Wang ZG (2000). Rational evolutionary design: the theory of in vitro protein evolution. *Adv Protein Chem*, 2000;55:79-160.

Volner A, Zoidakis J, Abu-Omar MM (2003). Order of substrate binding in bacterial phenylalanine hydroxylase and its mechanistic implication for pterin-dependent oxygenases. *J Biol Inorg Chem*, ;8(1-2):121-8.

Wang A, Bolen DW (1997). A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry*, 36(30):9101-8.

Wang Y, DeMayo JL, Hahn TM, Finegold MJ, Konecki DS, Lichter-Konecki U, Woo SL (1992). Tissue and development-specific expression of the human phenylalanine hydroxylase/chloramphenicol acetyltransferase fusion gene in transgenic mice. *J Biol Chem*, 25;267(21):15105-10.

Wang W (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 185(2):129-88.

Wang W (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 203(1-2):1-60

Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR (2000). Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol Genet Metab*, 69(2):101-10.

Weglage J, Schuierer G, Kurlemann G, Bick R, Ullrich K (1993). Different degrees of white matter abnormalities in untreated phenylketonurics: findings in magnetic resonance imaging. *J Inherit Metab Dis*, 16(6):1047-8.

Wright JM, Zeitlin PL, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB (2004). Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line demonstrates a major influence on heat-shock proteins, *Physiol Genomics*, 16(2):204-11.

Wynn RM, Song JL, Chuang DT (2000). GroEL/GroES promote dissociation/reassociation cycles of a heterodimeric intermediate during alpha(2)beta(2) protein assembly. Iterative annealing at the quaternary structure level. *J Biol Chem*, 275(4):2786-94.

Xie M, Schowen RL (1999). Secondary structure and protein deamidation. *J Pharm Sci*, 88(1):8-13.

Yang DS, Yip CM, Huang TH, Chakrabartty A, Fraser PE (1999). Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones. *J Biol Chem*, 274(46):32970-4.

ANEXOS

Anexo I

Sequência do cDNA PAH (GeneBank 49897)

(O codão de iniciação ATG está sublinhado)

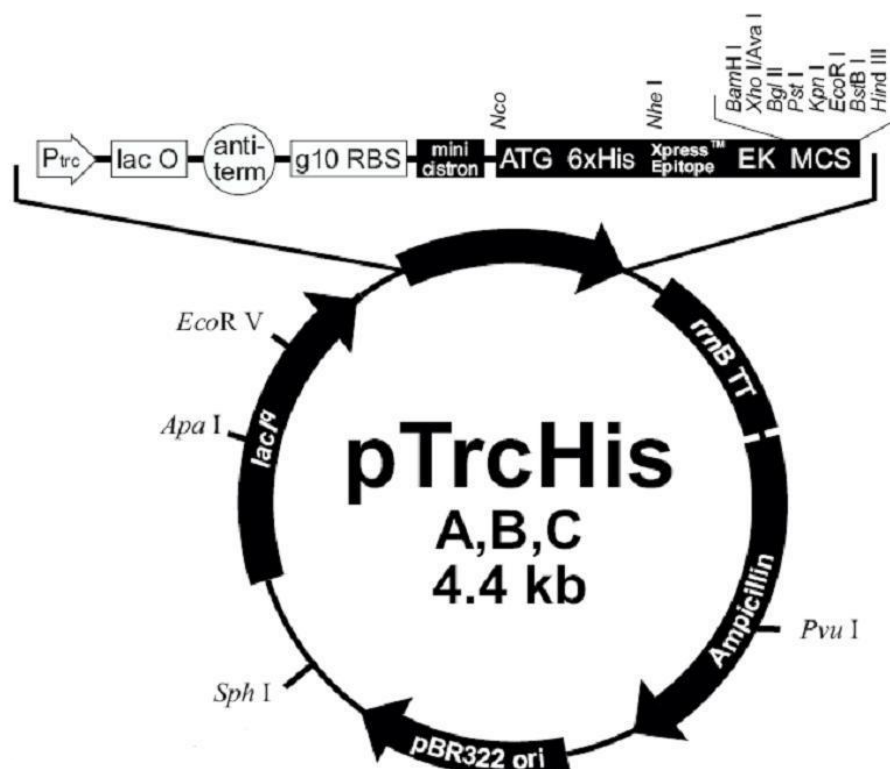
```

1  cagctggggg taaggggggc ggattattca tataattggt ataccagacg gtcgcaggct
61 tagtccaatt gcagagaact cgcttcccag gcttctgaga gtcccgaag tgcctaaacc
121 tgtctaatacg acggggccttg ggtggcccggt cgctccctgg cttcttcctt ttaccacagg
181 cgggcagcga agtgggtgcct cctgcgtccc ccacacccctc cctcagcccc tccccctcgg
241 cccgtccttg gcaggtgacc tggagcatcc ggcaggctgc cctggcctcc tgcgtcagga
301 caagcccacg aggggcgtta ctgtgcggag atgcaccaag caagagacac cctttgtaac
361 tctcttctcc tccctagtgc gaggttaaaa ccttcagccc cactgctgtg ttgcaaacct
421 gctgtacctt gaggccttaa aaagccagag acctcactcc cggggagcca gcatgtccac
481 tgcggtcctg gaaaacccag gcttgggcag gaaactctct gactttggac aggaacaacg
541 ctatattgaa gacaactgca atcaaaatgg tgccatatca ctgatcttct cactcaaaag
601 agaagtgggt gcattggcca aagtattgct cttatttgag gagaatgatg taaacctgac
661 ccacattgaa tctagacctt ctctgtttaa gaaagatgag tatgaatttt tcaccatttt
721 ggataaacgt agcctgcctg ctctgacaaa catcatcaag atcttgaggc atgacattgg
781 tgccactgtc catgagcttt cactgagataa gaagaaagac acagtgcctt ggttcccaag
841 aaccattcaa gagctggaca gatttgccaa tcagattctc agctatggag cggaaactgga
901 tgctgaccac cctggtttta aagatcctgt gtaccgtgca agacggaagc agtttgctga
961 cattgcctac aactaccgcc atgggcagcc catccctcga gtggaatata tggaggaaag
1021 aaagaaaaca tggggcacag tggtcaagac tctgaagtcc ttgtataaaa cccatgcttg
1081 ctatgagtac aatcacattt ttccacttct tgaaaagtac tgtggcttcc atgaagataa
1141 cattccccag ctggaagacg tttctcaatt cctgcagact tgactgggtt tccgctcccg
1201 acctgtggct ggcctgcttt cctctcgga tttcttggtt ggcctggcct tccgagtctt
1261 cactgcaca cagtacatca gacatggatc caagcccatg tatacccccg aacctgacat
1321 ctgccatgag ctgttgggac atgtgcctt gttttcagat cgcagctttg cccagtttct
1381 ccaggaaatt ggccttgctt ctctgggtgc acctgatgaa tacattgaaa agctcgccac
1441 aatttacttg tttactgttg agtttgggct ctgcaaaaca ggagactcca taaaggcata
1501 tggtgctggg ctccctgcat cctttggtga attacagtac tgcttatcag agaagccaaa
1561 gcttctcccc ctggagctgg agaagacagc catccaaaat taaactgtca cggagtcca
1621 gccctgtat tacgtggcag agagttttaa tgatgccaag gagaaagtaa ggaactttgc
1681 tgccacaata cctcggccct tctcagttcg ctacgacca taacccaaa ggattgaggt
1741 cttggacaat acccagcagc ttaagatttt ggctgattcc attaacagtg aaattggaat
1801 cctttgcagt gccctccaga aaataaagta aagccatgga cagaatgtgg tctgtcagct
1861 gtgaatctgt tgatggagat ccaactattt ctttcacag aaaaagtcg aaaaagcaac
1921 cttaatttga aataacagcc ttaaattcct tacaagatgg agaacaaca aataagtcaa
1981 aataatctga aatgacagga tatgagtaca tactcaagag cataatggta aatcttttgg
2041 ggtcatcttt gatttagaga tgataatccc atactctcaa ttgagttaa tcaagtaatct
2101 gtcgcatttc atcaagatta attaaaattt gggacctgct tcattcaagc ttcatatatg
2161 ctttgacagag aactcataaa ggagcatata aggcataatg taaaacacaa gactgtcatt
2221 agaattgaat tattgggctt aatataaatc gtaacctatg aagtttattt tctattttag
2281 ttaactatga ttccaattac tactttgtta ttgtacctaa gtaaattttc tttaggtcag
2341 aagccatta aaatagttac aagcattgaa cttctttagt attatatata tataaaaaca
2401 tttttgtatg ttttattgta atcataaata ctgctgtata aggtaataaa actctgcacc
2461 taatcccat aacttccagt atcattttcc aattaattat caagtctgtt ttgggaaca
2521 ctttgaggac atttatgatg cagcagatgt tgactaaagg cttggttggt agatattcag
2581 gaaatgttca ctgaataaat aagtaaatatc attattgaaa agcaaatctg tataaatgtg
2641 aaatttttat ttgtattagt aataaaacat tagtagttta

```


Anexo II

Vector pTrcHis



pTrcHis B

4404 nucleótidos 91-221

lac operator: bases 228-248

rrnB anti-termination sequences: bases 264-333

T7 gene 10 translational enhancer: bases 346-354

Ribosome binding site: bases 370-374

Mini-cistron: bases 383-409

Polyhistidine and enterokinase cleavage site: bases 425-504

Xpress™ epitope: bases 482-505

Multiple cloning site: bases 515-554

rrnB transcriptional termination sequence: bases 637-794

Ampicillin resistance ORF: bases 1074-1934

pBR322 origin: bases 2079-2752

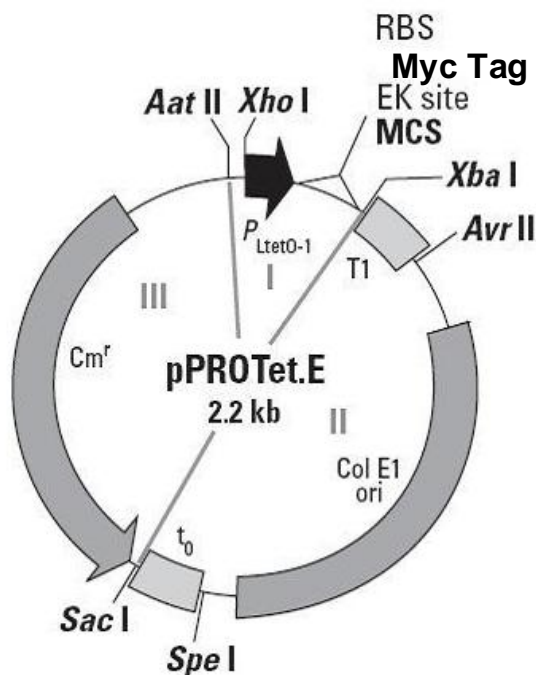
lac P ORF: bases 3281-4365

pTrcHis Multiple Cloning Site

pTrcHis forward primer																	Mini cistron																																																		
RBS																																																																			
361	AAAATTA AAAG AGGTATATAT TA																	ATG TAT CGA TTA AAT AAG GAG GAA TAA ACC																																																	
	Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu ***																																																																		
Polyhistidine (6xHis) region																																																																			
413	ATG GGG GGT TCT				CAT CAT CAT CAT CAT CAT						GGT ATG GCT AGC ATG ACT																																																								
	Met Gly Gly Ser				His His His His His His						Gly Met Ala Ser Met Thr																																																								
gene 10 leader																	Xpress™ Epitope										EK recognition sequence										Bam HI																														
461	GGT GGA CAG CAA				ATG		GGT CGG		GAT CTG		TAC		GAC GAT		GAC GAT		AAG		GAT																																																
	Gly Gly Gln Gln				Met		Gly Arg		Asp		Leu Tyr		Asp Asp		Asp Asp		Lys		Asp																																																
Xho I Sac I Bgl II																	Psr I										Kpn I										EcoRI										BsrBI										Hind III										EK cleavage site
509	CCG AGC		TCG AGA		TCT		GCA		GCT		GGT		ACC		ATA		TGG		GAA		TTC		GAA		GCT		TGG																																								
	Pro Ser		Ser Arg		Ser		Ala		Ala		Gly		Thr		Ile		Trp		Glu		Phe		Glu		Ala		Trp																																								
557	CTG		TTT		TGG		CGG		ATG		AGA		GAA		GAT		TTT		CAG		CCT		GAT		ACA		GAT		TAA		ATC																																				
	Leu		Phe		Trp		Arg		Met		Arg		Glu		Asp		Phe		Gly		Pro		Asp		Thr		Asp		***																																						

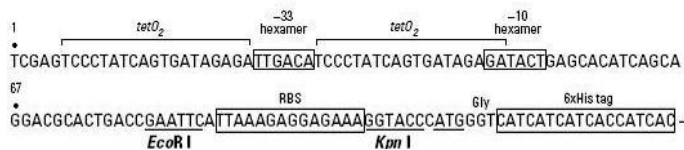
Retirado de http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ptrchis_man.pdf

Vector pProTet.E

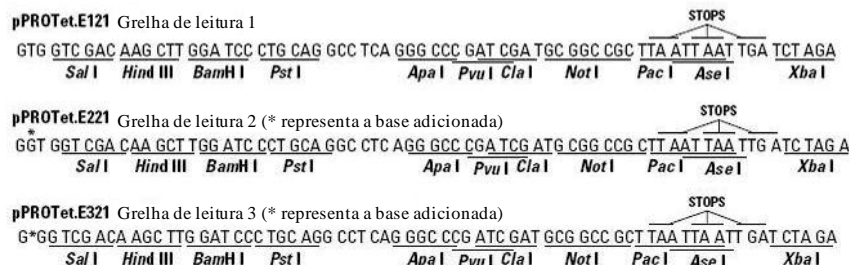


- A cauda de histidinas original (Hys Tag) deste vector foi substituída por uma cauda Myc (Myc Tag).
- O vector pProTet.E possui uma origem de replicação Col E1, uma resistência a antibiótico, o cloranfenicol (Cm^r), um local de restrição para a enterocinase (EK), um *Multiple Cloning Site* (MCS) e vários locais de restrição.

Promotor pProTet.E

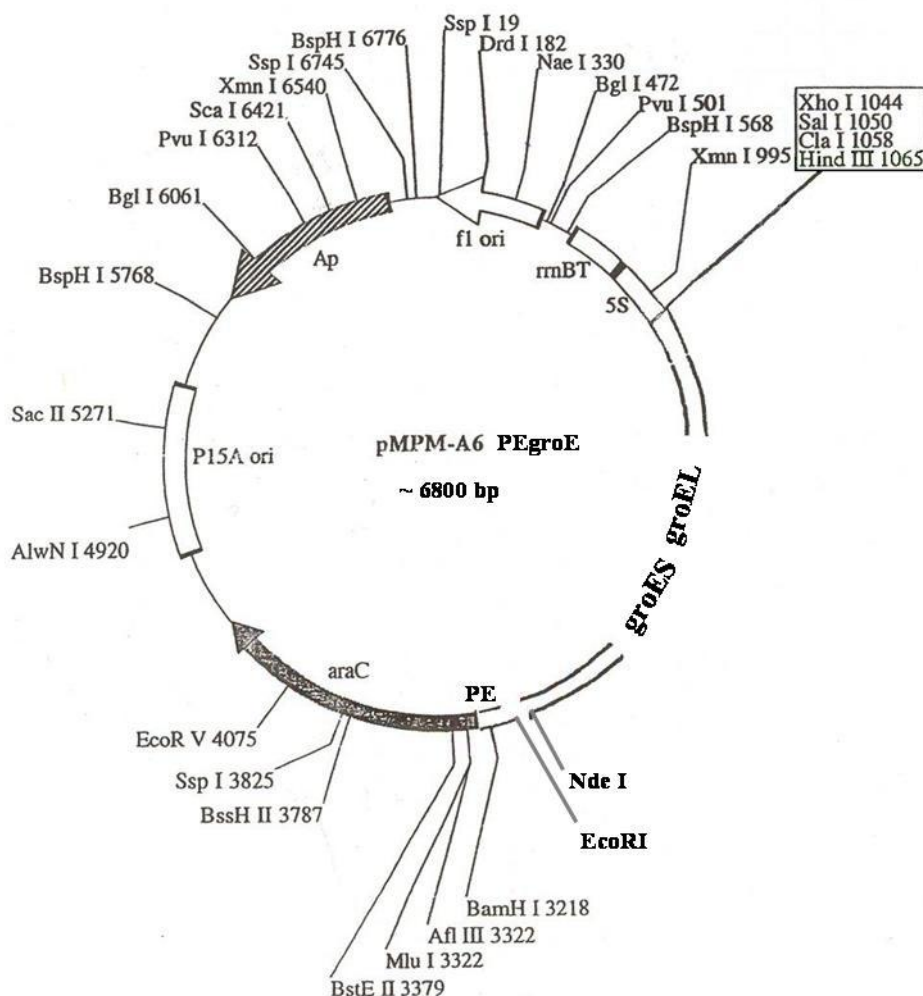


Multiple Cloning Site pProTet.E



Retirado de Pro™ Tet 6xHN Bacterial Expression System User Manual (www.clontech.com)

Vector pMPMAG-PEgroE



pMPMAG-PEgroE

(Construído por France Ballivet)

- Os genes *groES* *groEL* estão clonados entre os locais de restrição *EcoRI* e *HindIII*.
- O fragmento *BamHI* – *EcoRI*, de 75 pb, no vector original, foi substituído pelo fragmento *BamHI* – *EcoRI*, de 150 pb, contendo o promotor *groE*.
- Existe um local de restrição *NdeI*, próximo do local de restrição *EcoRI*, cuja sequência ATG é o primeiro codão de *groES*.

5' - GAATTCATATG - 3'
 EcoRI *NdeI*

Agradecimentos

Quero agradecer antes de mais à Prof. Doutora. Paula Leandro, pois sem ela este trabalho não teria sido possível, desde o início. Ao aceitar-me como sua aluna de doutoramento abriu caminho para 4 anos muito importantes na minha vida. O seu entusiasmo pelo trabalho desenvolvido foi constante e precioso para o desenvolver desta tese.

Quero também agradecer à Prof. Doutora Isabel Tavares de Almeida, por me ter integrado e aceite no seu grupo, ainda como estagiária, assim como pelos seus conselhos, sempre úteis e pela sua orientação.

Ao Prof. Doutor Cláudio Gomes, do ITQB, por me ter aceite e acolhido durante uns meses no seu grupo de trabalho. Também sem ele parte deste trabalho não teria sido possível. As suas ideias e raciocínios foram igualmente úteis e importantes. Agradeço também ao Hugo Botelho, pela sua constante disponibilidade e auxílio no trabalho que realizei, assim como às restantes pessoas do grupo, que de algum modo ajudaram.

Aos meus colegas de laboratório Marta Conceição, Catarina Coelho, João Leandro, Sara Violante, Ana Bravo, Ana Jorge, Carla Martins, Filipa Sequeira, Carlos Acosta, Cláudia Oliveira, que de algum modo ajudaram neste trabalho ou que apenas com a sua companhia e amizade tornaram os momentos de trabalho mais agradáveis.

Agradeço também à Prof. Doutora Isabel Rivera, que orientou o meu estágio e tornou possível o meu primeiro conhecimento sobre a PKU, à Doutora Fátima Ventura, à Prof. Doutora Maria João Silva, e a todos os restantes elementos do sub-grupo de Bioquímica.

À Isabel Serra, à Ana, e à Odete quero agradecer o empenho e profissionalismo que sempre demonstraram. Também com o seu trabalho contribuíram para uma boa realização do trabalho no laboratório.

Ao Prof. Doutor António José Almeida e ao Prof. Doutor Jorge Vítor, que por muitas vezes nos auxiliaram no trabalho desenvolvido.

Por último quero agradecer aos meus pais, por todo o esforço que fizeram, pois sem eles certamente nunca teria chegado aqui. Em especial agradeço ao meu pai o facto de estar sempre presente, e apesar de por vezes criticar as minhas escolhas, continuar a apoiá-las.

Ao Luís, quero não só agradecer o facto de ter participado neste trabalho, como por tudo o resto, pela sua paciência, carinho, companhia e ajuda. Sem ele os meus momentos de desânimo teriam sido bem piores.

A todos os restantes amigos que foram importantes ao longo destes anos, mas que não estão aqui referidos, muito obrigada.

